



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FERNANDA CARLA HENRIQUE BANA

**RESPOSTAS METABÓLICAS DE *Bifidobacterium lactis*:**  
**ABORDAGENS *IN VIVO* E *IN VITRO***

---

Londrina  
2019

FERNANDA CARLA HENRIQUE BANA

**RESPOSTAS METABÓLICAS DE *Bifidobacterium lactis*:**  
**ABORDAGENS *IN VIVO* E *IN VITRO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de  
Londrina, como requisito parcial à obtenção do título  
de Doutora em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Wilma Aparecida  
Spinosa

Coorientadora: Profa. Dra. Giselle Aparecida  
Nobre Costa

Londrina  
2019

FERNANDA CARLA HENRIQUE BANA

**RESPOSTAS METABÓLICAS DE *Bifidobacterium lactis*:**  
**ABORDAGENS *IN VIVO* E *IN VITRO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de  
Londrina, como requisito parcial à obtenção do título  
de Doutora em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Wilma Aparecida Spinosa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Fernando César de Macedo Junior  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Karla Bigetti Guergoletto Universidade  
Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Tatiana Colombo Pimentel Instituto  
Federal do Paraná - IFPR

---

Dra. Adriana Aparecida Bosso Universidade  
Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 25 de março de 2019.

### ***Dedico***

*A Deus, meu Pai amoroso, por derramar Sua graça sobre mim e por fazer infinitamente mais do que pedi ou sonhei. Sem o Senhor, sei que eu não teria conseguido.*

*A meu marido, Luiz Fernando Bana, por seu cuidado, valorização e compreensão. Sem você, as conquistas profissionais não fariam tanto sentido.*

*A meus pais, Dionísia e Henrique, pela dedicação e amor depositados em mim por toda a minha vida. Sem vocês, sonhar tão alto, nunca teria sido possível. Essa conquista é nossa e vou continuar fazendo tudo por NÓS. Amo vocês!*

## AGRADECIMENTOS

À Professora **Wilma Aparecida Spinosa**, pelo suporte, orientação, carinho e transmissão de força. Serei eternamente grata pela sua acolhida de “mãe”. Desde então você tem sido minha mentora, fonte de conhecimento e inspiração e, como resultado, tive o maior crescimento profissional desse período de doutoramento.

À Professora **Giselle Nobre Costa**, muito mais que coorientadora, a idealizadora desse trabalho. Além de ser uma inspiração de professora e amiga presente em todos os momentos em que precisei. Agradeço a valiosa orientação, paciência e as palavras de encorajamento e entusiasmo. Você fez essa etapa ser muito mais leve e prazerosa.

Ao Professor **Fernando César Macedo**, pela orientação, encorajamento, ensinamentos e auxílio na utilização do espectrômetro de RMN e interpretação dos dados. Agradeço muito a acolhida e confiança.

À Professora **Lucia Helena Miglioranza**, pela oportunidade concedida, incentivo e ensinamentos. Agradeço o carinho desde o mestrado e por despertar meu interesse no fascinante “mundo dos probióticos”.

Ao Professor **Glenn R. Gibson** pela acolhida na Universidade de Reading, Inglaterra, e oportunidade de executar parte experimental da tese com seu grupo de pesquisa. Agradeço os conhecimentos compartilhados, experiências inesquecíveis e por ter me permitido viver uma etapa imprescindível para meu crescimento pessoal e intelectual.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos pelos ensinamentos, em especial, **Karla Guergoletto**, **Marta de Toledo Benassi** e **Fabio Yamashita**, pelo apoio, conselhos e inspiração.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, em especial, **Bruna Yoshida**, **Julyene Francisco** e **Rodolfo Zanin** pela amizade há tantos anos (desde a Graduação). Vocês fizeram toda a diferença e me alegraram muito durante essa caminhada.

Às amigas **Liliane Oliveira** e **Ingrid Felicidade**, pela parceria, disponibilidade e apoio emocional e nos experimentos.

Ao estagiário **Anderson Takihara**, hoje já mestrando do Programa, pelo comprometimento e dedicação no desenvolvimento parcial das atividades de laboratório.

Às amigas de Reading, **Xuedan Wang (Holly)**, **Carolina Bruschi**, **Marcia Boura**, **Ana Contente**, **Tiffany Lau** e **Fei Lu**, pelo acolhimento em outro país, ensinamentos e amizade. Vocês tornaram o meu sonho - de doutorado sanduíche - ainda mais intenso e especial.

Aos integrantes do grupo de pesquisa da professora Wilma e do Laboratório de Análise de Alimentos (Prestação de Serviços), em especial, **Rebeca Catarino**, **Natália Norika**, **Viviane Lopes**, **Milena Poças** e **Diego Marestoni**, pelos bons momentos que passamos juntos e pelo apoio e companheirismo. É uma alegria fazer parte do grupo “Fermentados”.

À **Natalia Romero**, técnica do Laboratório Multiusuário de Espectroscopia da UEL, pela paciência, agendamentos e companhia nos almoços nos dias de análise.

À **Confepar** pela doação do leite em pó e a todos os **voluntários** que participaram espontaneamente do ensaio *in vivo*.

Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial às sempre dispostas **Sandra Rezende, Patrícia Sambatti e Alessandra Belitardo**.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos** do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela concessão de bolsa de estudo de doutorado e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/MEC)** pela concessão de bolsa de Doutorado Sanduíche por meio do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE.

Por fim, mas não menos importante, agradeço principalmente a **Deus** por **TUDO** que tem feito por mim. E com todo meu amor, agradeço a meu **marido, pais, irmãos, sogros e familiares** que estiveram comigo, como sempre, me dando todo suporte emocional necessário.

A todos que participaram dessa trajetória e sem os quais não teria sido possível chegar até aqui...

**Muito obrigada!**

*Bíblia sagrada*  
**Porque dEle e por Ele, e para Ele, são todas as coisas;  
glória, pois, a Ele eternamente. Amém.**  
Romanos 11:36

BANA, Fernanda Carla Henrique. **Respostas metabólicas de *Bifidobacterium lactis*: abordagens *in vivo* e *in vitro***. 2019. 141 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

Microrganismos probióticos são reconhecidos como promotores da saúde metabólica humana devido à capacidade de modular a composição da microbiota intestinal e os metabólitos produzidos por esta. Considerando que muitos dos efeitos de probióticos são linhagem-específicos, os estudos com uma espécie ou linhagem não podem ser extrapolados para outras. Dessa forma, em virtude das informações escassas a respeito do metabolismo de *Bifidobacterium lactis* HN019, este trabalho objetivou avaliar o seu potencial como microrganismo fermentador em leite e seu impacto sobre a microbiota fecal humana, bem como avaliar o efeito do consumo de um leite contendo a linhagem sobre a impressão digital metabólica de um grupo de mulheres com sobrepeso. Um leite probiótico contendo *B. lactis* HN019 foi desenvolvido e sua viabilidade e produção de ácidos foram monitorados durante a fermentação e armazenamento refrigerado, assim como o impacto da produção de ácidos na aceitação sensorial. As fermentações das linhagens HN019 e Bb12, isoladamente e em combinação com fruto-oligossacarídeo, foram avaliadas em um modelo de simulação intestinal *in vitro*, para verificação dos efeitos das linhagens e simbióticos nos principais grupos bacterianos da microbiota fecal humana e na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Um estudo metabonômico foi realizado para avaliação do efeito da linhagem HN019 sobre a assinatura digital metabólica do plasma de 60 mulheres com sobrepeso, via espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio acoplada à análise estatística multivariada. As voluntárias foram randomizadas em dois grupos de intervenção e, durante 60 dias, o grupo probiótico (n=30) consumiu um leite contendo  $9,6 \times 10^{10}$  UFC/dose (80 mL) da linhagem, enquanto o grupo placebo (n=30) consumiu um leite esterilizado sem a linhagem probiótica. Amostras de plasma sanguíneo das voluntárias foram coletadas na linha de base (tempo 0) e no final do estudo (60º dia) para investigação de alterações na assinatura digital metabólica após a intervenção. A partir do leite probiótico desenvolvido, foi observado, via RMN quantitativa, que a linhagem HN019 produziu um alto teor de ácido acético durante a fermentação láctea. Adicionalmente, a linhagem exibiu a estabilidade requerida em leites fermentados com alta contagem de células viáveis (acima de 9 Log UFC/mL) e baixa taxa de pós-acidificação durante 30 dias de armazenamento refrigerado. Na avaliação sensorial os julgadores preferiram o leite probiótico fermentado por oito horas, uma vez que após 72 horas o sabor acético já era perceptível. A fermentação *in vitro* das linhagens HN019 e *B. lactis* Bb12 não ocasionou uma mudança significativa nos principais grupos bacterianos da microbiota fecal humana ou na produção de AGCC. No entanto, quando associadas a fruto-oligossacarídeo, os simbióticos resultantes provocaram modulações benéficas na microbiota, por meio do aumento de bifidobactérias e produção de acetato e butirato. Modelos metabonômicos demonstraram, por intermédio da diferenciação das amostras entre a linha de base e o pós-consumo, um efeito do leite fermentado contendo a linhagem HN019 sobre a assinatura digital metabólica do plasma de mulheres com sobrepeso. Todavia, um impacto similar foi observado após o consumo do leite esterilizado (placebo), o que sugere um efeito do veículo do probiótico na modulação metabólica observada.

**Palavras-chave:** Fermentação. Metabonômica. Probióticos. RMN. Simbióticos. Sobrepeso.

BANA, Fernanda Carla Henrique. **Metabolic responses of *Bifidobacterium lactis*: in vivo and in vitro approaches.** 2019. 141 p. Thesis (Doctoral Degree in Food Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

Probiotic microorganisms are recognized as promoters of human metabolic health due to their ability to modulate the composition of the intestinal microbiota and its metabolites. Since many of the effects of probiotics are strain-specific, studies with a specific species or strain can not be extended to others. Therefore, due to the scarce information about the metabolism of *Bifidobacterium lactis* HN019, this work aimed to evaluate the potential of this microorganism as a fermenting microorganism in milk and its impact on the human faecal microbiota, as well as to evaluate the effect of the consumption of a milk containing the strain in the plasma metabolic profile of a group of overweight women. A probiotic milk containing *B. lactis* HN019 was developed and its viability and acid production were monitored during fermentation and cold storage, as well as the impact of acid production on sensory acceptance. The fermentations of HN019 and Bb12 strains, isolated and in combination with fructooligosaccharide, were evaluated in an intestinal simulation model, for investigation of the effects of the strains and synbiotics in the major groups of the human faecal bacteria and in the production of short-chain fatty acids (SCFA). A metabonomics study was performed to evaluate the effect of HN019 strain on plasma fingerprint of 60 overweight women, using high resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$  NMR) coupled with multivariate statistical analysis. The volunteers were randomized into two intervention groups and, during 60 days, the probiotic group ( $n = 30$ ) consumed a milk containing  $9.6 \times 10^{10}$  colony forming units (CFU)/dose (80 mL) of HN019 strain, whereas the placebo group ( $n=30$ ) consumed a sterilized milk without the probiotics. Blood plasma samples were collected at the baseline (day 0) and at the end of the study (day 60) to investigate changes in the metabolic profile after the intervention. From the probiotic fermented milk developed, it was observed, via quantitative  $^1\text{H}$  NMR, that HN019 strain produced a high content of acetic acid throughout fermentation. Additionally, the strain showed the stability required in fermented milks with high viable cell counts (above  $9 \log$  CFU/mL) and low activity of post-acidification during shelf life. In sensorial evaluation, the panelists preferred the probiotic milk fermented for eight hours because after 72 hours the acetic flavor was already perceptible. *In vitro* fermentation of HN019 and Bb12 strains did not cause significant changes in the major microbial groups of the human faecal microbiota or in the production of SCFA. However, when associated with fructooligosaccharide, the resulting synbiotics beneficially altered the metabolic profile of the human faecal microbiota by means of higher levels of bifidobacteria combined with significant increases in acetate and butyrate production. Metabonomics models showed a differentiation of the samples between the baseline and the post-consumption and consequent effect of the fermented milk containing HN019 strain on the metabolic plasma profile of overweight women. However, a similar impact was observed after consumption of the sterilized milk (placebo), suggesting an effect of the delivering vehicle on the metabolic modulation observed, which was independent of a concomitant consumption of probiotics.

**Key words:** Fermentation. Metabonomics. NMR. Overweight. Probiotics. Synbiotics.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	16
	<b>CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
1.1	MICROBIOTA INTESTINAL .....	18
1.1.1	Efeitos da Dieta na Diversidade da Microbiota.....	21
1.1.2	Epidemiologia do Excesso de Peso e Associação com a Microbiota e Metabólitos .....	23
1.2	PROBIÓTICOS .....	26
1.2.1	Efeitos Benéficos de Microrganismos Probióticos sobre o Hospedeiro .....	29
1.2.2	Gênero <i>Bifidobacterium</i> .....	32
1.2.2.1	Características taxonômicas, metabólicas e ecológicas.....	32
1.2.2.2	Bifidobactérias em produtos lácteos e seus efeitos benéficos .....	34
1.2.2.3	<i>Bifidobacterium lactis</i> .....	36
1.3	PREBIÓTICOS .....	37
1.3.1	Simbióticos .....	41
1.4	METABONÔMICA .....	42
1.4.1	Aplicação da Metabonômica na Ciência de Probióticos .....	43
1.4.2	Ressonância Magnética Nuclear na Metabonômica.....	45
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48

<b>CAPÍTULO 2 - <i>Bifidobacterium lactis</i> HN019: SURVIVAL, ACID PRODUCTION AND IMPACT ON SENSORY ACCEPTANCE OF FERMENTED MILK</b>	<b>68</b>
2.1 INTRODUCTION	69
2.2 MATERIAL AND METHODS	71
2.2.1 Sample, Microorganism and Chemicals	71
2.2.2 Production of Fermented Milk	71
2.2.3 Determination of pH and TA	72
2.2.4 Detection of Viable Cell Counts of Bifidobacteria	72
2.2.5 Effect of Cold Storage on Probiotic Survival	72
2.2.6 Sensory Analysis	73
2.2.7 Analytical Method	73
2.2.7.1 Calibration curves for isq <sup>1</sup> H NMR	73
2.2.7.2 isq <sup>1</sup> H NMR	74
2.2.7.3 Quantitative analysis by integration	74
2.2.8 Statistical Analyses	75
2.3 RESULTS AND DISCUSSION	75
2.3.1 Growth and Acidification Profile during Milk Fermentation	75
2.3.2 Cold Storage Viability and Post-acidification	77
2.3.3 Sensory Analysis	79
2.3.4 Determination of Organic Acids and Lactose in Fermented Milk by isq <sup>1</sup> H NMR	80
2.4 CONCLUSION	85
2.5 ACKNOWLEDGEMENTS	85
<b>REFERENCES</b>	<b>86</b>

	<b>CAPÍTULO 3 - <i>IN VITRO</i> EFFECTS OF <i>Bifidobacterium lactis</i>- BASED SYNBIOTICS ON HUMAN FAECAL BACTERIA</b> .....	93
3.1	INTRODUCTION.....	94
3.2	MATERIAL AND METHODS .....	96
3.2.1	Substrates.....	96
3.2.2	Faecal Sample Preparation .....	96
3.2.3	<i>In vitro</i> Batch Culture Fermentation.....	97
3.2.4	Enumeration of Bacterial Populations by FISH Analysis .....	97
3.2.5	SCFA Analysis .....	98
3.2.6	Statistical Analyses.....	99
3.3	RESULTS.....	99
3.3.1	Bacterial Enumeration by FISH Analysis .....	99
3.3.2	SCFA Production .....	103
3.4	DISCUSSION .....	105
3.5	CONCLUSION .....	107
3.6	DISCLOSURES/CONFLICTS OF INTEREST .....	108
3.7	ACKNOWLEDGEMENTS .....	108
3.8	FUNDING.....	108
	<b>REFERENCES</b> .....	108

	<b>CAPÍTULO 4 - METABONOMIC ASSESSMENT OF <i>Bifidobacterium</i> <i>lactis</i> HN019 EFFECTS IN OVERWEIGHT WOMEN</b> .....	115
4.1	INTRODUCTION.....	116
4.2	MATERIAL AND METHODS .....	118
4.2.1	Production of Probiotic Milk.....	118
4.2.2	Selection of Study Group .....	119
4.2.3	Study Design and Sample Collection .....	119
4.2.4	<sup>1</sup> H NMR Spectroscopy of Plasma Samples .....	120
4.2.5	NMR Data Processing and Multivariate Statistical Analysis .....	121
4.3	RESULTS AND DISCUSSION .....	122
4.4	CONCLUSION .....	127
4.5	ACKNOWLEDGEMENTS .....	128

<b>REFERENCES</b> .....	128
<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	134
<b>ANEXOS</b> .....	136
ANEXO I.....	137
ANEXO II .....	138

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

É estimado que os microrganismos que habitam nossos corpos atingem coletivamente mais de 30 trilhões de células ( $3,8 \times 10^{13}$ ), ou seja, células microbianas representam o mesmo número de células humanas (SENDER; FUCHS; MILO, 2016). A maioria desses microrganismos residem no trato gastrointestinal (TGI) e são fundamentais para influenciar a fisiologia e nutrição humana, além de favorecer a homeostase do intestino (KOPPEL; BALSUS, 2016).

Por esse motivo, a microbiota intestinal tem sido reconhecida como o “último órgão descoberto” do corpo humano ao demonstrar funções que variam desde auxílio na digestão e proteção contra patógenos até modulação do sistema imune e regulação do sistema nervoso central do hospedeiro, além de outras contribuições para o correto funcionamento do organismo (XU; KNIGHT, 2015). Alterações na microbiota “normal” (disbiose) têm sido relacionadas a doenças imunológicas e metabólicas em humanos (SANZ; RASTMANESH; AGOSTONIC, 2013; DAHIYA et al., 2017).

A obesidade é reconhecida como a doença responsável por outras diversas desordens metabólicas e quase atingiu o nível de pandemia ao progredir rapidamente nos últimos anos. Entre muitos fatores plausíveis para o desenvolvimento da obesidade, o papel da microbiota intestinal tem sido descrito como crucial. Diversos mecanismos pelos quais a microbiota induz a obesidade já foram relatados, em especial, a disbiose causa um desequilíbrio na homeostase energética que, em última instância, leva à obesidade (DAHIYA et al., 2017).

A microbiota intestinal tornou-se, dessa forma, um alvo de intervenção e foco de pesquisas que correlacionam a saúde metabólica e a dieta. Embora seja possível mudar a composição e o metabolismo das populações microbianas, por meio de intervenções dietéticas, essa interação ainda não é totalmente compreendida devido à composição complexa da microbiota intestinal em cada indivíduo (GIBSON et al., 2017; CHUNG et al., 2018). Nesse cenário, a introdução de probióticos, prebióticos e a combinação destes na alimentação, é reconhecida como uma maneira eficaz de modular o microbioma com o intuito de melhorar a saúde e reduzir o risco de doenças.

De fato, a literatura científica descreve os probióticos como promotores da saúde metabólica de humanos e animais. No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) segue a designação dos outros órgãos reguladores internacionais e define probiótico como “microrganismo vivo que, quando administrado em quantidades adequadas, confere um benefício à saúde do indivíduo”. Entre os diversos efeitos já comprovados, o benefício geral

dos probióticos deriva da criação de um ambiente intestinal mais favorável, por meio de mecanismos compartilhados por diferentes espécies. No entanto, é importante ressaltar que muitos efeitos de probióticos são linhagem-específicos (HILL et al., 2014; BRASIL, 2018).

Os gêneros mais utilizados como probióticos são *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sendo que as pesquisas e o interesse comercial no gênero *Bifidobacterium* têm aumentado exponencialmente nas últimas três décadas. Dentre muitas espécies, *B. lactis* tem sido estudada e aplicada em produtos lácteos probióticos (PRASANNA; GRANDISON; CHARALAMPOPOULOS, 2014). É importante ressaltar que embora bifidobactérias não apresentem um papel expressivo na acidificação do leite, elas são adicionadas em virtude dos efeitos positivos relacionados à saúde, e em geral são associadas a bactérias *starters* (PUNIYA, 2015). A aplicação de bifidobactérias e fermentação em produtos lácteos deve, no entanto, ser monitorada, uma vez que os metabólitos produzidos durante a fermentação podem influenciar a qualidade sensorial e nutricional dos produtos (BOUTEILLE et al., 2013).

Enquanto os probióticos constituem microrganismos vivos, prebióticos são nutrientes utilizados pelos microrganismos do TGI, incluindo linhagens probióticas administradas e microrganismos residentes (GIBSON et al., 2017). Ambos microrganismos e substratos podem ser combinados, para atuarem sinergicamente com o intuito de conferir benefícios adicionais, os quais são denominados simbióticos.

Diversas abordagens têm sido utilizadas para revelar as interações entre pro-, pre- ou simbióticos e a microbiota intestinal, incluindo genômica, transcriptômica, proteômica e, mais recentemente, metabonômica e áreas correlatas da metabolômica. Em particular, tem sido sugerido que a metabonômica poderia demonstrar como a estimulação biológica leva a mudanças na resposta metabólica de um organismo (CHUNG et al., 2018). Por exemplo, quando um organismo vivo sofre alguma perturbação, seja por doenças, toxinas, uso de drogas, suplementação alimentar, entre outros, ocorre uma série de processos com o objetivo de restaurar o equilíbrio do sistema, causando mudanças nas concentrações de metabólitos endógenos. A metabonômica propõe que essas mudanças possam ser identificadas como uma impressão digital (*fingerprint*) da perturbação (LINDON; NICHOLSON, 2008).

Para a detecção da variedade de metabólitos impactados, a estratégia metabonômica, em geral, emprega a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ). Esta técnica além de ser rápida, não-destrutiva e reprodutível, exige mínima preparação ou nenhuma manipulação de amostras, as quais são comumente biofluidos. O espectro obtido reflete, portanto, um perfil dos metabólitos presentes, por exemplo, na urina, plasma ou soro sanguíneo (MARKLEY et al., 2017).

Como a resposta dessa análise é um espectro complexo, para observar a diferença entre amostras de diferentes grupos após alguma intervenção dietética, é realizada a aplicação de técnicas quimiométricas à matriz de dados, com o intuito de extrair as informações relacionadas à impressão digital da perturbação (WANG et al., 2018). Dessa forma, a metabonômica pode ser utilizada para uma melhor compreensão dos efeitos de uma terapia probiótica. Estudos utilizaram, anteriormente, a abordagem metabonômica para avaliar o impacto do consumo de linhagens probióticas e demonstraram que os mesmos podem influenciar os metabólitos em biofluidos, tecidos e órgãos humanos, por meio da alteração de ácidos graxos de cadeia curta, aminoácidos e ácidos orgânicos, entre outros (HONG et al., 2011; PEDERSEN et al., 2011; BAJAJ et al., 2014; VAZQUEZ-FRESNO et al., 2014; MICCHELI et al., 2015; KIM et al., 2017). No entanto, até o momento, não se tem conhecimento do estudo de bifidobactérias e seus possíveis impactos no plasma sanguíneo de indivíduos com sobrepeso.

Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa relatou previamente efeitos favoráveis de *B. lactis* HN019 sobre composição corporal, perfil lipídico e biomarcadores inflamatórios ou oxidativos em pacientes com e sem síndrome metabólica, cuja dieta foi suplementada com leite probiótico (BERNINI et al., 2016; BERNINI et al., 2018). Recentemente, o efeito da linhagem foi avaliado em indivíduos com menor grau de adiposidade e contrastado com um grupo controle que também consumiu leite esterilizado, uma vez que o leite por si contém componentes bioativos, tais como peptídeos bioativos, que podem alterar o metabolismo. Os resultados deste trabalho evidenciaram um efeito da linhagem na redução de citocinas pró-inflamatórias (OLIVEIRA, 2018), o que nos instigou a questionar se a alteração desses parâmetros pode estar associada a intermediários metabólicos.

Em virtude das informações escassas a respeito do metabolismo de *B. lactis* HN019, este trabalho objetivou avaliar seu potencial como microrganismo fermentador em leite e seu impacto *in vitro* sobre a microbiota fecal humana. Adicionalmente, foi avaliado o efeito de um leite contendo a linhagem HN019, via RMN de  $^1\text{H}$ , na assinatura digital metabólica do plasma de mulheres com sobrepeso.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Verificar a eficiência de *Bifidobacterium lactis* como microrganismo fermentador em leite e seu impacto *in vitro* sobre a microbiota fecal humana, bem como avaliar o efeito da linhagem *B. lactis* HN019 sobre a assinatura digital metabólica do plasma de um grupo de mulheres com sobrepeso, cuja dieta foi suplementada com leite probiótico durante 60 dias.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um leite probiótico contendo *B. lactis* HN019 e monitorar sua viabilidade e produção de ácidos láctico e acético durante a fermentação e armazenamento refrigerado, assim como o efeito da produção de ácidos na aceitação sensorial.

- Investigar as propriedades de fermentação *in vitro* de *B. lactis* HN019 e *B. lactis* Bb12, isoladamente e em combinação com fruto-oligossacarídeo (FOS), por meio do impacto destes nos principais grupos bacterianos da microbiota fecal humana e na produção de ácidos graxos de cadeia curta.

- Avaliar o efeito do consumo de um leite esterilizado (placebo) ou um leite probiótico contendo *B. lactis* HN019 sobre a assinatura digital metabólica do plasma sanguíneo de 60 mulheres com sobrepeso, via Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

## REFERÊNCIAS

- BAJAJ, J. S.; HEUMAN, D. M.; HYLEMON, P. B. et al. Randomised clinical trial: *Lactobacillus* GG modulates gut microbiome, metabolome and endotoxemia in patients with cirrhosis. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 39, p. 1113–1125, 2014.
- BERNINI, L. J.; SIMÃO, A. N.; ALFIERI, D. F. et al. Beneficial effects of *Bifidobacterium lactis* on lipid profile and cytokines in patients with metabolic syndrome: a randomized trial. Effects of probiotics on metabolic syndrome. **Nutrition**, v. 32, n. 6, p. 716-719, 2016.
- BERNINI, L. J.; SIMÃO, A. N.; SOUZA, C. H. B. et al. Effect of *Bifidobacterium lactis* HN019 on inflammatory markers and oxidative stress in subjects with and without the metabolic syndrome. **British Journal of Nutrition**, v. 120, p. 645-652, 2018.
- BOUTEILLE, R.; GAUDET, M.; LECANU, B.; THIS, H. Monitoring lactic acid production during milk fermentation by *in situ* quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 4, p. 2071-2080, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução, RDC nº 241, de 26 de julho de 2018. **Requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC\\_241\\_2018\\_.pdf/941cda52-0657-46dd-af4b-47b4ee4335b7](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC_241_2018_.pdf/941cda52-0657-46dd-af4b-47b4ee4335b7)>. Acesso em: 26 nov 2018.
- CHUNG, H.; SIM, J.; MIN, T.; CHOI, H. Metabolomics and lipidomics approaches in the science of probiotics: a review. **Journal of Medicinal Food**, v. 21, n. 11, p. 1086-1095, 2018.
- DAHIYA, D. K.; RENUKA; PUNIYA, M. et al. Gut microbiota modulation and its relationship with obesity using prebiotic fibers and probiotics: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, e563, 2017.
- GIBSON, G. R., HUTKINS, R., SANDERS, M. E., et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491-502, 2017.
- HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506-514, 2014.
- HONG, Y. S.; HONG, K. S.; PARK, M. H. Metabonomic understanding of probiotic effects in humans with irritable bowel syndrome. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 45, n. 5, p. 415-425, 2011.
- KIM, M.; KIM, M.; KANG, M. et al. Effects of weight loss using supplementation with *Lactobacillus* strains on body fat and medium-chain acylcarnitines in overweight individuals. **Food & Function**, v. 8, p. 250–261, 2017.

KOPPEL, N.; BALSUS, E. P. Exploring and understanding the biochemical diversity of the human microbiota. **Cell Chemical Biology**, v. 23, n. 1, p. 18-30, 2016.

LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K. Spectroscopic and statistical techniques for information recovery in metabonomics and metabolomics. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 1, p. 45-69, 2008.

MARKLEY, J. L.; BRÜSCHWEILER, R.; EDISON, A. S. et al. The future of NMR-based metabolomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 43, p. 34-40, 2017.

MICCHELI, A.; CAPUANI, G.; MARINI, F. et al. Urinary <sup>1</sup>H-NMR-based metabolic profiling of children with NAFLD undergoing VSL#3 treatment. **International Journal of Obesity**, v. 39, p. 1118–1125, 2015.

OLIVEIRA, L. G. S. **Efeito imunomodulador de leite probiótico com *Bifidobacterium lactis* HN019 em indivíduos com sobrepeso**. 2018. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) - Unidade Piza, Universidade Pitágoras Unopar, Londrina, 2018.

PEDERSEN, S. M.; NEBEL, C.; NIELSEN, C. N. et al. A GC–MS-based metabonomic investigation of blood serum from irritable bowel syndrome patients undergoing intervention with acidified milk products. **European Food Research and Technology**, v. 233, p. 1013-1021, 2011.

PRASANNA, P. H.; GRANDISON, A. S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. **Food Research International**, v. 55, p. 247-262, 2014.

PUNIYA, A. K. **Fermented milk and dairy products**. Boca Raton: CRC Press, 2015.

SANZ, Y.; RASTMANESH, R.; AGOSTONIC, C. Understanding the role of gut microbes and probiotics in obesity: How far are we? **Pharmacological Research**, v. 69, p. 144-155, 2013.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. **PLOS Biology**, v. 14, n. 8, e1002533, 2016.

VAZQUEZ-FRESNO, R.; LLORACH, R.; MARINIC, J. et al. Urinary metabolomic fingerprinting after consumption of a probiotic strain in women with mastitis. **Pharmacological Research**, v. 87, p. 160-165, 2014.

WANG, M.; ZHANG, X.; WANG, Y. et al. Metabonomic strategy for the detection of metabolic effects of probiotics combined with prebiotic supplementation in weaned rats. **RSC Advances**, v. 5042, 2018.

XU, Z.; KNIGHT, R. Dietary effects on human gut microbiome diversity. **British Journal of Nutrition**, v. 113, S1-5, 2015.

## CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 MICROBIOTA INTESTINAL

Humanos e outros animais desenvolvem um relacionamento simbiótico obrigatório com trilhões de microrganismos (bactérias, vírus, arqueas e eucariotos microscópicos) e, portanto, possuem as superfícies de suas mucosas colonizadas por uma microbiota extremamente complexa. Estudos das últimas duas décadas têm decifrado uma grande diversidade e abundância de microrganismos, especialmente bactérias, que vivem no corpo humano e de fato, há cada vez mais evidências de que esses seres microscópicos desempenham um papel fundamental na manutenção da saúde (KOPPEL; BALSUS, 2016; (SENDER; FUCHS; MILO, 2016).

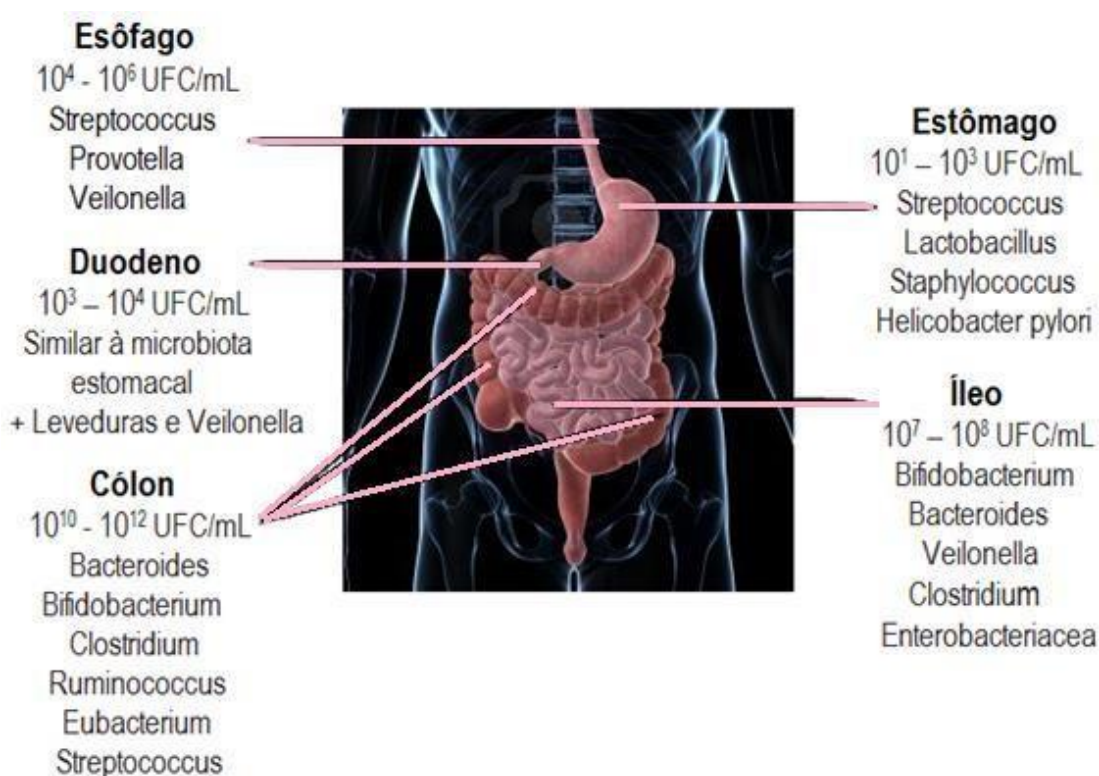
Particularmente o trato gastrointestinal humano (TGI), é o sistema que hospeda o maior número de microrganismos, pois apenas o cólon abriga 70% destes, e maior diversidade de bactérias (>1000 espécies) dentre aquelas que colonizam o corpo humano (QIN et al., 2010; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ; DE VOS, 2014; DERRIEN; HYLCKAMA; VLIEG, 2015). Esta comunidade microbiana comensal do TGI, chamada coletivamente de microbiota intestinal (seus genes são conhecidos como microbioma), é vital a inúmeras funções fisiológicas e homeostáticas. Além disso, exerce um papel importante no metabolismo e nutrição (por meio do aproveitamento de nutrientes da dieta e fermentação de carboidratos não digeríveis), defesa do hospedeiro por meio da maturação e modulação do sistema imune, uma vez que 80% do potencial imune se concentra na mucosa do intestino, além da proteção contra microrganismos patogênicos (BEVINS; SALZMAN, 2011; XU; KNIGHT, 2015).

Esta microbiota, composta predominantemente por microrganismos anaeróbios estritos e facultativos, encontra-se distribuída de forma heterogênea e demonstra um aumento progressivo ao longo do TGI, de forma que sua densidade e composição são altamente variáveis em cada órgão e entre indivíduos (SIMRÉN et al., 2013).

As características específicas de cada órgão, como potencial de óxi-redução, pH, disponibilidade de nutrientes, entre outras, são os fatores responsáveis pela diferença de densidade e variedade das células microbianas (Figura 1). No TGI superior (esôfago e estômago), o ambiente é desfavorável para a colonização e proliferação bacteriana devido à ação bactericida do suco gástrico. Já nas porções iniciais do intestino delgado (duodeno e jejuno), a presença da bile e da secreção pancreática, e o peristaltismo levemente elevado também resultam em uma microbiota reduzida (SEKIROV et al., 2010).

Em contrapartida, o intestino delgado distal, denominado íleo, com diminuição do peristaltismo, mantém uma microbiota com maiores níveis populacionais. Finalmente, o intestino grosso, presente na porção inferior do TGI, é o principal sítio de colonização ( $9 \times 10^{11}$  células/g de conteúdo luminal), com maior atividade metabólica e diversidade microbiana provavelmente por sua baixa motilidade intestinal e o baixo potencial de óxido-redução (LEY; PETERSON; GORDON, 2006; SENDER; FUCHS; MILO, 2016).

**Figura 1.** Estimativa dos principais gêneros microbianos da microbiota intestinal encontrados em diferentes órgãos do trato gastrointestinal humano.



**Fonte:** adaptado de Tiihonen; Ouwehand; Rautonen (2010).

Além da variação na concentração das células ao longo do TGI, determinadas espécies são encontradas tipicamente em diferentes regiões, reguladas pelo próprio meio, à medida que as condições se apresentam favoráveis ou não (SIMRÉN et al., 2013). Dessa forma, a microbiota é dinâmica e sua composição é influenciada por diversos fatores, dentre eles o ambiente do órgão, idade do hospedeiro e sua imunidade, fatores genéticos e ambientais, dieta e exposição a quimioterápicos, antibióticos e probióticos/prebióticos (DUPONT; DUPONT, 2011; RAJOKA et al., 2017).

Devido a tantos fatores, há mais de um século, a descrição e compreensão da complexidade e ecologia da microbiota intestinal tornou-se um grande desafio para

pesquisadores ao redor do mundo. Apenas a partir de 2005, com o advento da metagenômica observou-se uma revolução no conhecimento deste ecossistema complexo por meio da análise dos múltiplos genomas da microbiota do TGI (ECKBURG et al., 2005; FEENEY; SLEATOR, 2012).

De acordo com estudos baseados em metagenômica, os intestinos de humanos contêm poucas divisões bacterianas quando comparados com outros habitats, como o solo, que possui no mínimo 20 divisões (BÄCKHED et al., 2005). Apenas oito do total de 55 divisões bacterianas conhecidas são compreendidas ao longo do TGI humano. Entre estas, cinco são mais comumente encontradas: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* (ECKBURG et al., 2005; LEY; PETERSON; GORDON, 2006). No entanto, apenas *Firmicutes* e *Bacteroidetes* demonstram-se dominantes totalizando mais de 85% de toda a população (NEEF; SANZ, 2013).

Apesar da escassez de filos representados em humanos, há um excesso notável na diversidade de filotipos (similaridades na sequência de ácido desoxiribonucleico - DNA - que classificam um grupo de organismos) em termos de espécie e linhagem (DETHLEFSEN; MCFALL-NGAI; RELMAN, 2007). Apesar da grande diversidade, aproximadamente 160 espécies dominantes são encontradas no intestino grosso de um indivíduo adulto e a minoria destas é compartilhada entre indivíduos não relacionados (MARCHESI et al., 2016).

Na realidade, à medida que ocorre mudança de fases, da infância até a velhice, nossa microbiota se altera. Logo após o nascimento, o TGI estéril de um recém-nascido é exposto a uma grande diversidade de microrganismos. Dessa forma, sua microbiota intestinal se desenvolve rapidamente, sendo influenciada por fatores genéticos, perfil de microbiota da mãe, via de parto (normal ou cesáreo) e o ambiente do nascimento (ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004). Posteriormente, durante os primeiros dias de vida os principais fatores que influenciam a microbiota ainda instável são a alimentação (amamentação versus fórmulas infantis) e o ambiente externo, no entanto, a grande mudança na composição ocorre com a introdução de alimentos sólidos e com o desmame (KOENIG et al., 2011).

Dessa forma, a composição da microbiota começa a convergir para uma microbiota adulta no final do primeiro ano de vida, assemelhando-se totalmente a um adulto com aproximadamente 2,5 a 3 anos (KOENIG et al., 2011). Essa colonização inicial influencia irreversivelmente a microbiota posterior e a saúde da criança (ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004). Com o passar do tempo, as bactérias comensais que formaram a microbiota do recém-nascido e outras que as sucedem, multiplicam-se exponencialmente assemelhando-se quantitativamente às células do nosso corpo (razão de bactérias para células

humanas de 1:1) e alcançam um peso estimado de 0,2 quilogramas (SENDER; FUCHS; MILO, 2016).

Apesar da similaridade na densidade de células, evidências de estudos estabeleceram que cada indivíduo possui uma microbiota característica única. Assim, ainda que sigamos o padrão geral de dois filos predominantes, estudos têm descrito uma diversidade considerável mesmo entre indivíduos saudáveis (QIN et al., 2010; CLEMENTE et al., 2012; THE HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012). Embora esta diferença seja especialmente apontada nos três primeiros anos de vida quando a microbiota ainda é instável, sendo a microbiota de bebês e crianças geralmente enriquecidas pelo gênero *Bifidobacterium*, adultos saudáveis possuem uma microbiota relativamente estável e uma combinação própria de bactérias (espécies autóctones e alóctones) (FLINT et al., 2015).

Esta diversidade microbiana interpessoal pode ser dependente de vários fatores. Por esse motivo, muitos estudos foram realizados para compreensão do que realmente estabelece o perfil da microbiota intestinal humana, o conjunto de genes microbianos (microbioma) e suas funções a serem expressadas. Segundo os pesquisadores os fatores determinantes podem incluir dieta (DAVID et al., 2014; CHUNG et al., 2016), genética do hospedeiro e relacionamentos familiares (TURNBAUGH et al., 2009; YATSUNENKO et al., 2012), diferentes culturas e geografia (DE FILIPPO et al., 2010; YATSUNENKO et al., 2012), idade (MARIAT et al., 2009; CLAEISSON et al., 2011); gravidez (KOREN et al., 2012); via de parto (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010), obesidade, síndrome metabólica e diabetes tipo II (TURNBAUGH et al., 2009; QIN et al., 2010; ISMAIL et al., 2011; VRIEZE et al., 2012), doença cardiovascular (WANG et al., 2011), distúrbios produzidos por antibióticos (O'SULLIVAN et al., 2013) incluindo colites pseudomembranosas causadas por *Clostridium difficile* (GOUGH; SHAIKH; MANGES, 2011) e outras formas de doenças inflamatórias intestinais (FRANK et al., 2007; WILLING et al., 2010; SIMRÉN et al., 2013). Especificamente a dieta tem demonstrado efeitos significativos sobre a microbiota.

### 1.1.1 Efeitos da Dieta na Diversidade da Microbiota Intestinal

A dieta humana é composta principalmente pelos macronutrientes alimentares: carboidratos (entre eles, as fibras), proteínas e gorduras. Estudos têm demonstrado que o tipo e a quantidade desses macronutrientes presentes na dieta influenciam diretamente a composição e a atividade metabólica da microbiota intestinal (WU et al., 2011; RAJOKA et al., 2017). Determinada ingestão alimentar, a longo prazo, influencia a estrutura e a atividade dos trilhões

de microrganismos que residem no intestino humano (XU; KNIGHT, 2015) e já foi demonstrado que o microbioma intestinal também pode responder rapidamente a dieta alterada, se composta inteiramente por alimentos animais ou vegetais (DAVID et al., 2014).

Em camundongos, a introdução de uma dieta com pouca gordura e rica em polissacarídeos de plantas em detrimento de uma dieta típica “ocidental”, rica em açúcar e gordura, mudou a microbiota com alterações nas vias metabólicas e expressão de genes (TURNBAUGH et al., 2009). Outro estudo em humanos constatou, da mesma forma, mudanças na microbiota fecal dentro de 24 horas, quando uma dieta pobre em gordura/rica em fibra foi alterada para outra rica em açúcar/pobre em fibra e vice-versa (WU et al., 2011).

De fato, a dieta ocidental moderna tem mudado ao longo do tempo com o aumento da ingestão calórica total, e mudanças nas quantidades relativas de componentes dietéticos, incluindo menor consumo de fibras alimentares e vegetais e maior consumo de gordura e carboidratos de baixa qualidade (refinados). Já é bem estabelecido que esse tipo de dieta, especialmente devido à falta de fibras, contribui não apenas para a perda da diversidade da microbiota, mas promove também um desequilíbrio em relação às bactérias intestinais patogênicas associadas a muitas doenças inflamatórias (RICHARDS et al., 2016). Por exemplo, populações humanas com uma dieta enriquecida em carboidratos complexos, apresentam uma maior diversidade da microbiota intestinal (SCHNORR et al., 2014), enquanto a ingestão a longo prazo de uma dieta rica em gordura e açúcar pode levar à “extinção” vários grupos da microbiota (SONNENBURG et al., 2016).

Esse impacto da industrialização e mudança dos hábitos alimentares sobre a microbiota também foi evidenciado por meio de uma clara separação na composição da microbiota fecal de crianças africanas e crianças italianas. As 14 crianças de Boulpon (vilarejo de Burkina Faso) possuíam uma dieta predominantemente vegetariana, sendo pobre em gordura e proteína animal e rica em amido, fibra e polissacarídeos de plantas. Por outro lado, as 15 crianças da área urbana de Florença (capital de Toscana) consumiam a dieta ocidental típica, rica em proteína animal, açúcar, gordura e pobre em fibra. A microbiota das crianças africanas apresentou um enriquecimento expressivo de *Bacteroidetes*, especialmente dos gêneros *Prevotella* e *Xylanibacter*, além de conter certos genes bacterianos para hidrólise da parede celular das plantas (xilanases e celulasas), totalmente ausente nas crianças europeias (DE FILIPPO et al., 2010).

Por esse motivo, a dieta mediterrânea, baseada em uma ingestão equilibrada de frutas, grãos, gordura monoinsaturada e poli-insaturada, tem sido indicada para manutenção de um estilo de vida saudável. Tem sido demonstrado que esse tipo de dieta tem capacidades anti-

inflamatórias e pode ainda reduzir a inflamação em doenças (DE FILIPPIS et al., 2016). Dietas vegetarianas também são reconhecidas como dietas saudáveis e benéficas, uma vez que podem proteger o hospedeiro de vários distúrbios crônicos, metabólicos e inflamatórios (FERROCINO et al., 2015).

Nesse sentido, a fermentação de carboidratos é uma atividade essencial da microbiota intestinal humana. Espécies dominantes e prevalentes de bactérias intestinais, incluindo as produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), parecem desempenhar um papel crítico na degradação inicial de polissacarídeos derivados de plantas complexas, colaborando com espécies especializadas na fermentação de oligossacarídeos (por exemplo, bifidobactérias), para liberar AGCC e gases que também são usados como fontes de carbono e de energia por outras bactérias mais especializadas (por exemplo, microrganismos acetogênicos redutores e metanogênicos e bactérias redutoras de sulfato) (MARCHESI et al., 2016).

Os AGCC derivados da fermentação de fibras alimentares pela microbiota intestinal são os metabólitos de dieta mais estudados, visto que possuem um efeito fisiológico positivo sobre a saúde do hospedeiro (RAJOKA et al., 2017). Os principais produtos de fermentação gerados, principalmente no cólon, como resultado de várias vias metabólicas bacterianas são acetato, propionato e butirato, além dos gases. Esses AGCC são cruciais para a saúde do intestino e suas atividades podem posteriormente influenciar locais distantes do intestino, com diferentes AGCC tendo variadas funções (KOH et al., 2016).

Além de inibir o crescimento de bactérias patogênicas e promover o crescimento de bactérias benéficas, por meio da diminuição do pH do cólon, os AGCC podem ainda modular diversos aspectos da atividade metabólica incluindo a função do colonócito, homeostase intestinal, sistema imunológico, lipídios sanguíneos, apetite, fisiologia renal e ganho de energia (O'KEEFE, 2016). Em relação ao ganho energético, AGCC podem fornecer calorias adicionais quando oxidados pelo hospedeiro e estariam envolvidos no desenvolvimento da obesidade ao favorecer o ganho de peso na forma de gordura corporal. No entanto, tais calorias adicionais fornecidas pela fermentação de carboidratos não digeríveis podem não ser suficientes para produzir mudanças significativas no peso (SCHWIERTZ et al., 2010).

### 1.1.2 Epidemiologia do Excesso de Peso e Associação com a Microbiota e Metabólitos

A prevalência da obesidade tem aumentado de forma constante entre os adultos, adolescentes e crianças e é considerada uma epidemia mundial. Em 2016, mais de 1,9 bilhões de adultos (aproximadamente 39% da população mundial), já eram sobrepesos, destes mais de

650 milhões (cerca de 13%) eram obesos. Embora ainda seja mais evidente em países ocidentais, este aumento também tem alcançado os países mais pobres do mundo e, por consequência, a obesidade mundial quase triplicou desde 1975 (WHO, 2018).

O sobrepeso e a obesidade são acessados com o cálculo do índice de massa corpórea (IMC) do indivíduo. Pessoas com um IMC igual ou maior do que 25 ou 30 kg/m<sup>2</sup> são consideradas sobrepeso ou obesas, respectivamente (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2002; WHO, 2018). Adicionalmente, valores de IMC e de circunferência da cintura elevados estão associados diretamente aos marcadores de risco cardiovascular, como colesterol total, triglicerídeos, glicemia, pressão arterial e baixas concentrações de lipoproteína de alta densidade (HDL) (BOMBELLI et al., 2013).

A obesidade é caracterizada por um peso corporal excessivo e pode ser causada principalmente por um desbalanço entre o consumo energético e seu gasto (JUNG; KIM, 2013). Globalmente, há um aumento da nutrição altamente energética contendo elevadas quantidades de gordura, açúcar e sódio. Além disso, o decréscimo na atividade física evolui cada vez mais devido ao aumento de ocupações sedentárias e melhoria dos meios de transporte, entre outros fatores (WHO, 2018).

No entanto, há também um crescente número de evidências de que apenas o consumo e gasto energético não justificam o aumento na prevalência da obesidade. As diversas causas que levam ao sobrepeso e, conseqüentemente, obesidade são muito complexas e incluem fatores genéticos, endócrinos e neurais, bem como à fatores comportamentais, sociais e culturais (JUNG et al., 2013; SANZ; RASTMANESH; AGOSTONIC, 2013). Há cerca de dez anos, a obesidade foi associada também com alterações estruturais na microbiota intestinal de humanos (LEY et al., 2005; TURNBAUGH et al., 2009) e animais (LEY et al., 2006), o que sugere uma potencial causalidade entre as funções de microrganismos específicos e essa desordem (SANZ; SANTACRUZ; GAUFFIN, 2010).

Embora diferenças na composição da microbiota fecal de obesos e magros ainda não sejam totalmente estabelecidas, uma vez que alguns estudos não encontraram grandes variações, predições do metabolismo da comunidade microbiana, baseadas em conteúdo dos genes, indicam que a microbiota associada a obesos possui uma capacidade maior em coletar energia dos alimentos, por meio da quebra mais eficiente de polissacarídeos (THE HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012). Segundo Turnbaugh e colaboradores (2006), uma quantidade menor de energia permaneceu nas fezes de camundongos obesos em relação a seus homólogos magros, comprovando essa capacidade aumentada que o microbioma

obeso possui em extrair energia da dieta (devido a um aumento de genes para o metabolismo de polissacarídeos).

Curiosamente, o fenótipo de coleta de energia também pode ser transmissível simplesmente pelo transplante da “microbiota obesa”. A colonização de camundongos isentos de microrganismos (*germ-free*) com uma ‘microbiota obesa’ resultou em um aumento significativo na gordura corporal quando comparados com os animais colonizados por uma ‘microbiota magra’ (TURNBAUGH et al., 2006; TURNBAUGH et al., 2008). De fato, a associação entre a composição da microbiota intestinal e o peso corporal é proveniente de estudos usando camundongos *germ-free* para demonstrar que os microrganismos intestinais protegem contra a obesidade induzida por dieta e que a microbiota está envolvida na regulação do armazenamento de gordura (BÄCKHED et al., 2007; RIDAURA et al., 2013).

Nesse sentido, a razão *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B) demonstra ser de significativa relevância em sinalizar o estado da microbiota intestinal, sendo frequentemente associada à saúde ou doença. Esta razão sofre um aumento desde o nascimento até a idade adulta e é ainda mais alterada com o avanço da idade, onde a proporção de *Firmicutes* é significativamente menor (CLAESSON et al., 2011). Ainda que existam evidências indicando que indivíduos obesos tem um aumento de *Firmicutes* e uma diminuição de *Bacteroidetes* (LEY et al., 2006; TURNBAUGH et al., 2009; ISMAIL et al., 2011), outros estudos falharam em reportar essas observações (DUNCAN et al., 2008; SCHWIERTZ et al., 2010).

Estudos em animais que investigaram os mecanismos relacionados em modelo animal, relataram que a microbiota intestinal realmente exerce um papel na obesidade ao contribuir com a digestão e absorção de nutrientes e adiposidade (BÄCKHED et al., 2007; SEMOVA et al., 2012). Alguns desses estudos já comprovaram que o papel dos microrganismos no balanço energético é secundário ao da dieta, visto que ela é o principal fator que influencia a estrutura da microbiota em animais (FLEISSNER et al., 2010; MURPHY et al., 2010) e humanos obesos (JUMPERTZ et al., 2011). Dessa forma, as alterações induzidas pela dieta na composição da microbiota contribuiriam para os aspectos de regulação do balanço energético do hospedeiro, incluindo absorção de lipídeos e estocagem de energia, o que enfatiza ainda mais a dependência de ambos os fatores (dieta e microbiota) (JUMPERTZ et al., 2011; SEMOVA et al., 2012).

Dessa forma, uma representação alterada de espécies, genes bacterianos e vias metabólicas, incluindo aquelas envolvidas na coleta de nutrientes, estão relacionadas à obesidade (TURNBAUGH et al., 2009). Além disso, a quantidade de AGCC produzida pela

microbiota intestinal também já foi mencionada como um dos fatores de desenvolvimento da obesidade (SCHWIERTZ et al., 2010).

Apesar do fato de que os AGCC são classicamente associados com benefícios metabólicos e magreza (RIDAURA et al., 2013), concentrações de AGCC são maiores nas fezes de humanos obesos em comparação com controles magros (SCHWIERTZ et al., 2010). Esses metabólitos podem constituir uma fonte de energia importante em humanos, visto que até 95% dos AGCC produzidos são prontamente absorvidos pelos colonócitos para utilização como substratos energéticos (CARDING et al., 2015). A fração que não é consumida pelos colonócitos é transportada por meio da membrana basolateral para o fígado através da corrente sanguínea. Dessa forma, além do seu papel local como substratos energéticos dentro do cólon, os AGCC agem como moléculas sinalizadoras envolvidas no metabolismo lipídico e regulação de glicose/insulina (DEN BESTEN et al., 2013). No entanto, ainda não está claro se os AGCC contribuem para a obesidade, visto que as calorias adicionais fornecidas pela fermentação de carboidratos podem não ser suficientes para produzir mudanças significativas no peso, ou se a presença deles apenas reflete a microbiota intestinal alterada (SCHWIERTZ et al., 2010; KOH et al., 2016).

Outra questão que permanece é se a disbiose da microbiota intestinal é uma causa direta de algum distúrbio relacionado ao metabolismo, ou se as mudanças nas comunidades microbianas intestinais nos indivíduos obesos são uma adaptação a uma mudança na dieta do hospedeiro (CARDING et al., 2015).

Nesse contexto de relação entre comunidade microbiana e desordens metabólicas, como a obesidade, o microbioma intestinal é cada vez mais reconhecido como um alvo de intervenção com potencial no gerenciamento da saúde e doença. Por esse motivo, microrganismos probióticos, prebióticos e a combinação deles (simbióticos) têm sido empregados na modulação da microbiota intestinal e são associados a melhorias em diversas desordens metabólicas (MIGLIORANZA SCAVUZZI et al., 2015).

## 1.2 PROBIÓTICOS

A utilização de produtos lácteos fermentados com fins de promoção da saúde iniciou-se muito tempo antes da descoberta dos microrganismos. O primeiro relato escrito data aproximadamente 76 a.C. quando o historiador romano Plínio recomendava a administração de produtos lácteos fermentados no tratamento de gastroenterites (BOTTAZI, 1983; JANKOVIC et al., 2010). No entanto, os estudos envolvendo estes microrganismos e seus efeitos clínicos

são contemporâneos, e se baseiam na produção de substâncias benéficas e/ou promoção de um equilíbrio microbiano que favoreça o hospedeiro (COSTA; MIGLIORANZA, 2012).

Estudos de diversos cientistas, principalmente microbiologistas, tornaram possível o desenvolvimento e a expansão do conhecimento a respeito da microbiota do corpo humano. Em 1885, Escherich foi o primeiro a reconhecer a importância de se examinar a ocorrência de bactérias nas fezes humanas para que, conseqüentemente, se pudesse compreender a fisiologia da digestão e a patologia e tratamento de doenças intestinais de origem microbiana (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Já o conceito de microrganismos benéficos foi pioneiramente aplicado em 1905 por Ilya Metchnikoff - cientista russo, prêmio Nobel e professor do Institute Pasteur - quando este sugeriu o impacto positivo do consumo de lácteos fermentados sobre a microbiota intestinal, atribuindo-lhes a propriedade de manutenção da saúde e longevidade do hospedeiro, por meio da colonização de lactobacilos e diminuição de patógenos (SOCCOL et al., 2010).

Décadas depois, o termo “probiótico” - pró-vida - foi inicialmente utilizado como antônimo da palavra “antibiótico”, sendo definido de diferentes formas por vários pesquisadores. Fuller (1989) popularizou o termo, com a definição mais frequentemente citada, quando definiu probiótico como “suplemento alimentar à base de microrganismos vivos, com efeitos benéficos ao hospedeiro por equilibrar sua microbiota intestinal”. Salminen e colaboradores (1999), estenderam a ação dos probióticos também às células inativas e propuseram sua inclusão na definição geral.

Em 2001, a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e a WHO (*World Health Organization*) mantiveram o conceito geral e definiram probióticos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001). Recentemente a definição do termo foi reafirmada pela atual Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP), visto que o conceito é suficientemente amplo para permitir que uma grande gama de produtos seja desenvolvida e suficientemente restrito para impor alguns requisitos fundamentais (HILL et al., 2014).

No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) segue a designação e define probiótico como “microrganismo vivo que, quando administrado em quantidades adequadas, confere um benefício à saúde do indivíduo”. A ANVISA também define linhagem como “subpopulação de células de uma mesma espécie que apresentam as mesmas características e são identificadas por números, letras ou nomes que seguem o epíteto específico” e ressalta que os efeitos benéficos atribuídos pelos probióticos são linhagem-

dependente, por esse motivo, nos produtos adicionados de probióticos, o benefício deve ser comunicado por meio da alegação de propriedade funcional ou de saúde aprovada para a linhagem específica (BRASIL, 2018).

Esta alegação de propriedade funcional ou de saúde deve ser proposta pela empresa na qual o produto é desenvolvido e será avaliada caso a caso. A empresa deve ainda apresentar laudo de análise que comprove a quantidade mínima viável do microrganismo para exercer a propriedade funcional alegada. Esta funcionalidade deve se estender até o final do prazo de validade do produto e nas condições de uso, armazenamento e distribuição (BRASIL, 2018). Nesse sentido, a legislação brasileira e os órgãos reguladores internacionais, não determinam a quantidade mínima de células probióticas adequadas para promoção de efeitos benéficos, no entanto, a ISAPP e alguns estudos recomendam a ingestão diária de pelo menos  $10^9$  UFC/porção do produto (BERTAZZONI et al., 2013; HILL et al., 2014; MENG et al., 2016).

Bertazzoni e colaboradores (2013) salientam que a concentração da formulação a ser ingerida deve ser ajustada. Tais ajustes devem compreender a diluição fisiológica que ocorre no TGI; a capacidade da linhagem probiótica em sobreviver ao ambiente do TGI; a forma de administração do probiótico; a linhagem probiótica (cada uma possui capacidades de sobrevivências únicas) e, finalmente, o efeito benéfico esperado. Adicionalmente, o número de bactérias viáveis que alcançam o intestino não depende apenas da dose ingerida, mas também de outros fatores. A própria composição da microbiota intestinal, motilidade intestinal e o pH gástrico individuais, bem como a formulação probiótica, e a coadministração de alimentos ou leites (que podem proteger o probiótico do ácido gástrico) interferem no número de bactérias finais que alcançarão o intestino.

Entre os diversos microrganismos probióticos, bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium* são as mais importantes comercialmente. Outras espécies potencialmente benéficas têm sido estudadas como “candidatas” a serem utilizadas em produtos, tais como *Akkermansia muciniphila* e *Faecalibacterium prausnitzii*, juntamente com outras bactérias produtoras de butirato, como *Roseburia* spp. e *Eubacterium hallii* (HILL et al., 2014). Adicionalmente, as leveduras *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* são utilizadas em preparações farmacêuticas como probiótico.

Curiosamente, alguns gêneros bacterianos, tais como *Escherichia* e *Enterococcus*, reconhecidos por conterem espécies potencialmente patogênicas, também possuem linhagens probióticas utilizadas em produtos comerciais, ainda que em uma escala

muito menor comparado aos lactobacilos e bifidobactérias (FRANZ et al., 2011; WASSENAAR, 2016).

Até então, o conceito probiótico é atrelado à ‘microrganismo vivo’, no entanto, esta abordagem vem sendo questionada gradativamente. Estudos têm demonstrado que os efeitos benéficos dos probióticos podem ser obtidos a partir da administração de células bacterianas mortas (LIM et al., 2009; ADAMS, 2010; HILL et al., 2014; SAWADA, 2016; ZENG et al., 2016). A maioria dos estudos com estes “probióticos fantasmas” têm o foco na modulação da resposta imune que as células inativadas ou seus fragmentos podem exercer sobre o hospedeiro (SAWADA, 2016). Nesse contexto, Taverniti e Guglielmetti (2011), definiram o termo técnico “paraprobióticos” como células microbianas intactas ou fragmentadas, não viáveis ou extratos celulares brutos que, quando administrados, via oral ou tópica, em quantidades adequadas, conferem benefícios ao consumidor humano ou animal.

### 1.2.1 Efeitos Benéficos de Microrganismos Probióticos sobre o Hospedeiro

O estudo no campo dos probióticos avançou consideravelmente nos últimos anos, devido à busca pela compreensão do papel da microbiota humana na saúde e na doença e à necessidade de definir estratégias eficazes para moldar uma microbiota saudável (HILL et al., 2014). Segundo o último relatório global da indústria, o mercado mundial de probióticos foi estimado em US\$67,2 bilhões no ano de 2018 com um crescimento previsto de 8,3% nos próximos oito anos. Outros principais fatores que impulsionam a demanda por tais produtos é o aumento da preocupação do consumidor em relação à saúde e o crescente número de benefícios associados a estes microrganismos (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2018).

Entre diversos benefícios, é importante ressaltar que a correção da microbiota autóctone desbalanceada constitui a racionalidade da terapia por probióticos. Dessa forma, estes microrganismos podem fornecer benefícios à saúde humana e animal, principalmente por intermédio da manutenção do equilíbrio e composição da microbiota intestinal. Além dos efeitos à saúde serem mediados por esse papel de normalização da composição da microbiota intestinal, outros efeitos como imunomodulação e manutenção da função barreira intestinal já foram comprovados (BOAVENTURA et al., 2012; MIGLIORANZA SCAVUZZI et al., 2015).

Nesse sentido, a ingestão de produtos contendo probióticos é utilizada com o objetivo de reforçar e/ou modificar a microbiota intestinal em busca da manutenção ou restabelecimento do equilíbrio microbiano. Os mecanismos e eficácia dos efeitos probióticos

dependem principalmente das interações entre estes microrganismos e a microbiota única do hospedeiro ou com as células imunocompetentes da mucosa intestinal (BOAVENTURA et al., 2012).

Definitivamente, a literatura científica reporta evidências clínicas suficientes para comprovar que as alegações de saúde atribuídas à probióticos são provenientes de um aumento destes em um dado ambiente e a uma diminuição de bactérias potencialmente patogênicas, entre outros fatores (JANKOVIC et al., 2010). Além disso, há anos é estabelecido que a ingestão de probióticos altera a microbiota fecal de indivíduos saudáveis, em favor de espécies de lactobacilos e bifidobactérias (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Desde a era Metchnikoff, um vasto número de efeitos benéficos tem sido reportado. A comprovação destes efeitos, com base em estudos *in vitro* e *in vivo* (ensaios clínicos bem controlados), é uma premissa dos órgãos reguladores de alimentos (OMS, FAO, ANVISA), tanto para caracterizar um microrganismo como probiótico, como para regularizar seu uso em alimentos ou fármacos (COSTA; MIGLIORANZA, 2012).

Cada vez mais, nosso conhecimento sobre probióticos e sua interação com o hospedeiro tem aumentado exponencialmente e muitos mecanismos de ação têm sido relatados. Geralmente microrganismos probióticos podem restaurar ou estimular linhagens bacterianas essenciais e necessárias para a maturação do intestino e homeostase, principalmente em hospedeiros onde esse processo de manutenção saudável foi interrompido ou é incompleto (PATEL; LIN, 2010).

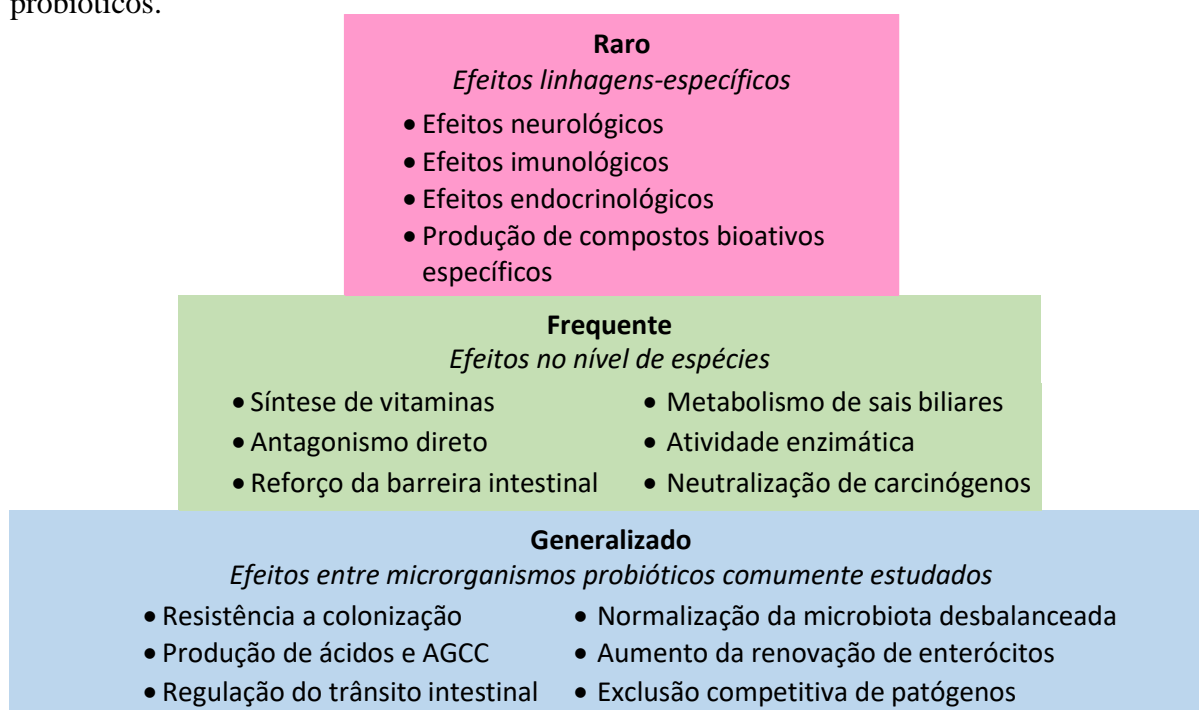
Além da melhora e aumento das funções benéficas no TGI e por consequência, no hospedeiro, outro aspecto importante da “estadia” temporária de microrganismos probióticos (como microbiota alóctone) é a capacidade que esses microrganismos possuem em deixar suas “marcas” na comunidade microbiana, tanto ao mudar a expressão de genes dos membros autóctones (no sentido de alterar as vias metabólicas dentro da célula) quanto estimulando ou “acalmado” a resposta imune (PATEL; LIN, 2010). McNulty e colaboradores (2011) propuseram que probióticos podem não somente alterar as proporções de bactérias de nossa microbiota, mas principalmente impactar a expressão de genes e produção de metabólitos bacterianos.

Para elucidação dos efeitos benéficos, muitos mecanismos de ação de probióticos podem estar envolvidos, no entanto, três principais mecanismos têm sido mais estudados. O primeiro é a supressão de contagens viáveis de bactérias patogênicas, por meio da competição por sítios de ligação (ou por espaço para adesão) no epitélio intestinal e na camada mucosa e competição por nutrientes, bem como pela produção de compostos antibacterianos,

tais como peptídeos antimicrobianos (beta-defensina-2), bacteriocinas e ácidos acético e láctico. O segundo mecanismo é por meio da alteração da atividade de enzimas microbianas. AGCC e bacteriocinas podem reduzir o pH luminal e fecal e diminuir a atividade de enzimas bacterianas indesejáveis. Por fim, o terceiro mecanismo é a estimulação da imunidade do hospedeiro devido ao aumento dos níveis de anticorpos (por exemplo, Imunoglobulina A) e leucócitos e atividade de macrófagos. Adicionalmente, probióticos podem aumentar a função barreira ao inibir a invasão de produtos microbianos (endotoxinas) (FULLER, 1989; MIGLIORANZA SCAVUZZI et al., 2015).

Em um sentido geral, a distribuição de mecanismos entre linhagens probióticas tem sido proposta (Figura 2). Embora atribuições específicas possam ser discutidas, alguns mecanismos podem ser generalizados entre uma diversidade de linhagens, enquanto outros são menos compartilhados, ou mais específicos. Desse modo, é importante destacar que alguns efeitos sobre o hospedeiro são linhagem-específicos, de forma que estudos com uma espécie ou linhagem não podem ser extrapolados para outras, mesmo aquelas estreitamente relacionadas (HILL et al., 2014; BRASIL, 2018).

**Figura 2.** Possível distribuição de mecanismos de ação atribuídos a microrganismos probióticos.



**Fonte:** Adaptado de Hill et al. (2014). AGCC: ácido graxo de cadeia curta.

Nesse contexto, em uma abordagem geral, diversas linhagens têm demonstrado melhorar parâmetros metabólicos tais como hipertensão (NARUSZEWICZ et al., 2002), obesidade (LUOTO et al., 2010; SANCHEZ et al., 2014; BERNINI et al., 2016), marcadores de inflamação (ASEMI et al., 2013; BARRETO et al., 2014), desordem na homeostase de glicose (LAITINEN et al., 2009; BARRETO et al., 2014), bem como níveis anormais de lipídios no plasma (dislipidemia) devido ao decréscimo da concentração de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (AGERHOLM-LARSEN et al., 2000; XIAO et al., 2003; CHANG et al., 2011; JONES et al., 2012; BERNINI et al., 2016), aumento de lipoproteína de alta densidade (HDL) (SADRZADEH-YEGANEH et al., 2010), redução de colesterol total (CT) (ATAIE-JAFARI et al., 2009) e uma melhora (diminuição) nas razões CT/HDL e LDL/HDL (EJTAHED et al., 2010).

Outros efeitos benéficos são atribuídos aos probióticos e requerem investigações mais aprofundadas. Por exemplo, alguns probióticos, tais como *Bifidobacterium infantis*, têm sido definidos como ‘psicobióticos’, ou seja, “microrganismos vivos, que quando ingeridos em quantidades adequadas, produzem um efeito benéfico em pacientes com doenças psiquiátricas”. Assim, probióticos ao produzir neurotransmissores poderiam também oferecer uma alternativa de tratamento da depressão e outros transtornos psiquiátricos (DINAN; STANTON; CRYAN, 2013). Alguns estudos abordam inclusive o efeito da microbiota do intestino sobre o Sistema Nervoso Central, destacando o papel das bactérias probióticas na comunicação bidirecional do eixo cérebro-intestino (EUTAMENE et al., 2007; DESBONNET et al., 2008; BRAVO et al., 2011). No entanto, esses estudos se concentram em sua maioria em modelos animais e seus efeitos ainda não podem ser extrapolado a humanos.

### 1.2.2 Gênero *Bifidobacterium*

#### 1.2.2.1 Características taxonômicas, metabólicas e ecológicas

As bifidobactérias foram originalmente isoladas e descritas no período de 1899-1900 por Henry Tissier (do Instituto Pasteur), que observou uma bactéria abundante em forma de Y nas fezes de crianças que se alimentavam de leite materno, mas não naquelas que se alimentavam de fórmulas (TISSIER, 1900; citado por LEAHY et al., 2005). Essa bactéria descoberta por Tissier foi denominada *Bacillus bifidus* devido à sua morfologia bifurcada, no entanto, sua localização taxonômica sofreu várias alterações, sendo designada também como *Bacteroides*, *Nocardia*, *Lactobacillus* e *Corynebacterium*, antes de ser proposta como um

gênero à parte por Orla-Jensen, em 1924, e finalmente aceita e reconhecida como tal no século XX (LEAHY et al., 2005; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

O gênero pertence ao Filo *Actinobacteria*, Classe *Actinobacteria*, Ordem *Bifidobacteriales* e Família *Bifidobacteriaceae*, sendo representado atualmente por cerca de 38 espécies e 9 subespécies, as quais foram isoladas principalmente do trato digestivo de mamíferos (TURRONI; SINDEREN; VENTURA, 2011; MILANI et al., 2013).

As bifidobactérias são descritas como microrganismos anaeróbios obrigatórios, embora algumas linhagens possam tolerar o oxigênio. São bactérias imóveis, catalase negativa, Gram positivas, heterofermentativas, não formadoras de esporos, em forma de bastonetes curvos, caracterizadas, frequentemente, por uma bifurcação em forma de Y. Linhagens isoladas de fezes frescas apresentam formas que variam desde ramificadas, a formas bifurcadas de Y e V. No entanto, em meios de culturas não favoráveis, as bifidobactérias podem se apresentar pleomórficas. A maioria das bifidobactérias isoladas de seres humanos cresce à temperatura ótima de 36-38°C, são ácido tolerantes, e o pH ótimo para seu crescimento está entre 6,5-7,0 (LEAHY et al., 2005).

Além disso, as bifidobactérias são microrganismos sacarolíticos e todas as linhagens caracterizadas possuem a habilidade de fermentar glicose, galactose e frutose, com produção, principalmente, de ácido acético e ácido lático (PRASANNA; GRANDISON; CHARALAMPOPOULOS, 2014). Elas produzem, a partir do metabolismo de 2 moles de glicose, tanto o ácido acético quanto o ácido lático por uma via incomum, que resulta em uma proporção teórica de 3:2 para acetato/lactato, como metabólitos primários. É importante ressaltar que as proporções dos produtos finais da fermentação variam consideravelmente entre as linhagens e também dependem da fonte de carbono utilizada (SCARDOVI et al., 1971; BOTTACINI et al., 2014; HENRIQUE-BANA et al., 2019).

De maneira geral, bifidobactérias metabolizam hexoses ao utilizar a “via bífida”. A enzima chave envolvida nessa via é a frutose-6-fosfatofosfoquetolase (F6PPK), presente intracelularmente e, que quebra frutose-6-fosfato em acetil-1-fosfato e eritrose-4-fosfato. Esta enzima é utilizada como uma ferramenta na identificação do gênero; no entanto, não permite a distinção no nível de espécie (KUN et al., 2008).

Dessa forma, devido à sua capacidade metabólica, estas bactérias frequentemente incluídas no grupo das bactérias ácido lácticas (BAL), não devem ser classificadas como tal. Além da quantidade dos produtos finais de fermentação, são filogeneticamente distantes deste grupo, devido à presença da enzima F6PPK, e diferenças no seu conteúdo de guanina e citosina (G + C), que varia entre 55% a 67% (VASILJEVIC; SHAH,

2008). No entanto, por razões práticas e tradicionais, elas são por vezes consideradas como pertencentes ao grupo das BAL (RUSSEL et al., 2011).

Em relação a sua ecologia, as bifidobactérias têm sido isoladas de sete diferentes nichos: o intestino humano, vagina humana, a cavidade oral, alimentos, TGI animal, intestino de insetos e esgoto (RUSSEL et al., 2011). As espécies mais abundantes encontradas naturalmente no TGI incluem *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum* e *B. longum* subsp. *longum* (*B. longum*) em adultos e *B. breve*, *B. longum* subsp. *infantis* (*B. infantis*), *B. longum* subsp. *longum* (*B. longum*) em crianças (LEIVERS et al., 2011; ISHIZUKA et al., 2012).

#### 1.2.2.2 Bifidobactérias em produtos lácteos e seus efeitos benéficos

Leites fermentados são produzidos pela adição de culturas microbianas no leite cru ou tratado termicamente. Especificamente, os leites fermentados e outros produtos lácteos probióticos, têm sido amplamente explorados comercialmente, devido às propriedades funcionais tecnológicas, como preservação (aumento da vida útil do produto), produção de características sensoriais desejáveis por meio da formação de ácidos e compostos aromáticos, melhoria do sabor global e textura, emulsificação e vários benefícios nutricionais (PUNIYA, 2015).

Por esse motivo, os produtos lácteos, tais como bebidas lácteas fermentadas e iogurtes probióticos, apresentam grande representatividade no mercado mundial e ainda são os principais produtos comercializados como probióticos (MARKET RESEARCH REPORT, 2018). Entre esses, os lácteos obtidos a partir de linhagens de *Bifidobacterium* são uma categoria importante em todo o mundo, visto que as atividades metabólicas desse gênero são consideradas relevantes para a manutenção da saúde e consequente bem-estar do hospedeiro (PRASANNA; GRANDISON; CHARALAMPOPOULOS, 2014).

Além disso, bifidobactérias são geralmente encontradas no TGI em uma correlação inversa de determinadas bactérias como espécies de clostrídios e *Escherichia coli* patogênicas, o que sugere que sua atividade metabólica exerce um papel na diminuição de microrganismos indesejáveis (PRASANNA; GRANDISON; CHARALAMPOPOULOS, 2014). Dessa forma, são reconhecidas por seu papel promotor de saúde no intestino do consumidor e por esse motivo, a incorporação de bifidobactérias em leites fermentados e outros produtos lácteos fermentados não é recente.

Ainda que linhagens de *Bifidobacterium* já sejam utilizadas em lácteos e possuam um longo histórico de uso seguro como probiótico, elas apresentam características fermentativas inferiores, comparadas às BAL, o que dificulta suas possíveis aplicações. Mais especificamente, elas multiplicam pouco e com baixa produção de ácido em leite de vaca, além de requererem longos tempos de fermentação, fatores de crescimento, condições anaeróbicas e baixo potencial redox (PRASANNA; GRANDISON; CHARALAMPOPOULOS, 2014). Embora o leite contenha todos os nutrientes essenciais para seu crescimento, estes nem sempre estão em formas aceitáveis ou em concentração ótimas. Vários aminoácidos que estimulam ou são essenciais à multiplicação de bifidobactérias (por exemplo, arginina, glutamato, leucina, triptofano, tirosina, cisteína e valina) estão presentes em quantidades insuficientes ou compõem peptídeos (PUNIYA, 2015), o que os indisponibiliza para metabolismo.

O tempo prolongado de fermentação pode ocasionar alguns “defeitos” em leites fermentados tais como sabor e aroma acéticos desagradáveis, separação do soro e textura arenosa ou viscosa. Além disso, durante seu crescimento, bifidobactérias são incapazes de produzir quantidades suficientes de ácido láctico para o desenvolvimento de leites fermentados com o pH e acidez apropriados (PUNIYA, 2015). É importante ressaltar que para ser considerado um leite fermentado conforme determina a legislação vigente no Brasil, o produto deve ter acidez entre 0,6 a 2,0% (Norma FIL, 117A:1988 - BRASIL, 2007).

Apesar das dificuldades supracitadas de aplicação em produtos lácteos, o leite ainda é a melhor matriz carreadora de bifidobactérias, dessa forma, alternativas para superar estas limitações podem ser a não fermentação, associação com outras bactérias (utilização como co-cultura), concentração e secagem e/ou adicioná-las em outros produtos populares como iogurte (PUNIYA, 2015).

Diante desse contexto, as bifidobactérias têm sido intensamente exploradas pela indústria de alimentos nas últimas três décadas devido aos efeitos benéficos que exercem sobre o hospedeiro humano (GIOIA et al., 2014). Estudos em humanos e animais têm associado este gênero ao estabelecimento de uma microbiota saudável em recém-nascidos (WANG et al., 2007; MOHAN et al., 2008), uma melhora na digestibilidade da lactose e consequente redução na intolerância à lactose (JIANG; MUSTAPHA; SAVAIANO, 1996; HE et al., 2007), imunoestimulação (HE et al., 2002; MOHAN et al., 2008; DONG; YANG; WANG, 2010; ZHANG et al., 2010); redução dos níveis de CT, LDL e triglicérides e aumento de HDL (KIESSLING; SCHNEIDER; JAHREIS, 2002; XIAO et al., 2003; BERNINI et al., 2016), prevenção de diarreia (SHU; QU; GILL, 2001; QIAO et al., 2002), prevenção de infecções (GAGNON et al., 2006; SHIRASAWA et al., 2010; CHENOLL et al., 2011), produção de

AGCC (JIANG; SAVAINO, 1997), tratamento de doenças inflamatórias intestinais (KATO et al., 2004), redução dos sintomas da síndrome do intestino irritável (BRIGIDI et al., 2001; GUGLIEMETTI et al., 2011), atividade antitumoral (SINGH et al., 1997), além de outros benefícios.

Entre as espécies de bifidobactérias, *B. animalis* subsp. *lactis* tem sido destacada por sua alta tolerância em condições ácidas. Devido a esta e outras propriedades tecnológicas desejáveis, *B. lactis* é a espécie mais utilizada do gênero em produtos lácteos comerciais (RAEISI et al., 2013).

### 1.2.2.3 *Bifidobacterium lactis*

A bactéria probiótica *B. lactis* foi originalmente descrita como uma espécie por Meile e colaboradores (1997), no entanto, o estudo da similaridade molecular com *B. animalis* evidenciou sua reclassificação como uma subespécie: *B. animalis* subsp. *lactis* (MASCO et al., 2004).

Esta subespécie *lactis* é fenotipicamente distinta da subespécie *animalis* devido a sua melhor habilidade de se reproduzir no leite e em sua maior tolerância ao oxigênio (característica que a permite alcançar números elevados em produtos sob condições anaeróbicas) (MASCO et al., 2004). Por esse motivo, *B. lactis* tem sido estudada e aplicada em produtos lácteos probióticos comerciais, bem como em suplementos alimentares e preparações farmacêuticas.

Dentre as linhagens dessa espécie, *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 (BB-12<sup>®</sup>) constitui a bifidobactéria mais documentada do mundo. Ela tem sido amplamente utilizada em fórmulas infantis, suplementos dietéticos e produtos lácteos fermentados e seus efeitos benéficos à saúde têm sido demonstrados por meio de ensaios clínicos há mais de 30 anos (JUNGERSEN et al., 2014).

Por sua vez, a linhagem HN019 foi isolada a partir de um iogurte produzido na Nova Zelândia e posteriormente detectada pelo Instituto New Zealand Dairy Research que rastreou sua extensa coleção (mais de 2000 cepas) de lactobacilos e bifidobactérias em busca de novas bactérias probióticas. Após uma seleção inicial, 200 cepas foram investigadas minuciosamente. Destas, *B. lactis* HN019 destacou-se e foi considerada um probiótico em potencial, devido a sua capacidade de resistir a bile e a pH ácidos *in vitro* (PRASAD et al., 1998).

Desde sua descoberta, benefícios a saúde de animais e humanos já foram estabelecidos e associados à linhagem HN019, especialmente os relacionados ao incremento do sistema imunomodulador (SANDERS, 2006). Diversos autores constataram um aumento na resposta imunológica de roedores e humanos adultos e idosos por meio de uma suplementação com *B. lactis* HN019 (ARUNACHALAM; GILL; CHANDRA, 2000; CHIANG et al., 2000; GILL et al., 2001; GILL; RUTHERFURD; CROS, 2001; BOGSAN et al., 2014). Visto que a interação entre células probióticas e enterócitos tem sido descrita como um fator chave da imunomodulação e o fato de *B. lactis* HN019 demonstrar alta capacidade de adesão em diferentes tipos de células epiteliais humanas *in vitro*, tal propriedade pode ser associada aos efeitos benéficos conferidos ao sistema imune (GOPAL et al., 2001; LIU et al., 2010).

Além da imunomodulação, foi verificada a inibição de bactérias patogênicas *in vitro* e em animais por *B. lactis* HN019, bem como prevenção de infecções, promoção de crescimento em crianças e efeitos favoráveis sobre composição corporal, perfil lipídico e biomarcadores inflamatórios (SHU et al., 2000; GOPAL et al., 2001; SHU; GILL, 2001; SHU; QU; GILL, 2001; SAZAWAL et al., 2004; BERNINI et al., 2016). Adicionalmente, tem sido demonstrado, que *B. lactis* HN019, dose-dependente, diminui o trânsito intestinal em sujeitos com histórico de longo trânsito intestinal, além de conferir mudanças benéficas na microbiota intestinal (GOPAL; PRASAD; GILL, 2003; AHMED et al., 2007; WALLER et al., 2011).

A fim de simplificar sua nomenclatura e comercialização, atualmente a Dupont (HOWARU® Bifido) e a Fonterra (DR10™ ou DR20™) referem-se a linhagem supracitada como *B. lactis* HN019. Apesar do consenso de que os benefícios de probióticos são linhagem-dependente, de acordo com Milani e colaboradores (2013), o baixo nível de variabilidade genética apresentada pela subespécie *B. animalis* subsp. *lactis* revela implicações importantes em termos do uso de várias linhagens como bactérias promotoras de saúde. A aparente falta de grandes diferenças genômicas entre as 10 linhagens analisadas por esses pesquisadores sugere que estas podem exercer atividades de promoção de saúde similares.

### 1.3 PREBIÓTICOS

O primeiro experimento com humanos cuja microbiota havia sido enriquecida com lactobacilos após o consumo de carboidratos foi descrito em 1921 (RETTGER; CHEPLIN, 1921). A posterior constatação de que o cólon era dominado por microrganismos anaeróbios, muitos dos quais obtém energia fermentando substratos da dieta, deu início à pesquisa que desempenhou um importante fundamento em vários projetos de microbioma (SAVAGE, 1977).

Embora oligossacarídeos dietéticos tenham sido utilizados há muito tempo, principalmente na Ásia, com o objetivo de conferir benefícios à saúde, o conceito de prebiótico foi definido pela primeira vez em 1995 como “ingrediente alimentar não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade de um ou de um número limitado de bactérias já residentes no cólon” (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Tal conceito foi inicialmente embasado no termo probiótico, trocando o ‘pre’ por ‘pro’ que significa “antes” ou “para”, uma vez que enquanto probióticos utilizam microrganismos vivos, prebióticos são substratos não viáveis que servem como nutrientes para microrganismos vivos benéficos do intestino do hospedeiro, incluindo linhagens probióticas administradas e microrganismos residentes (GIBSON et al., 2017).

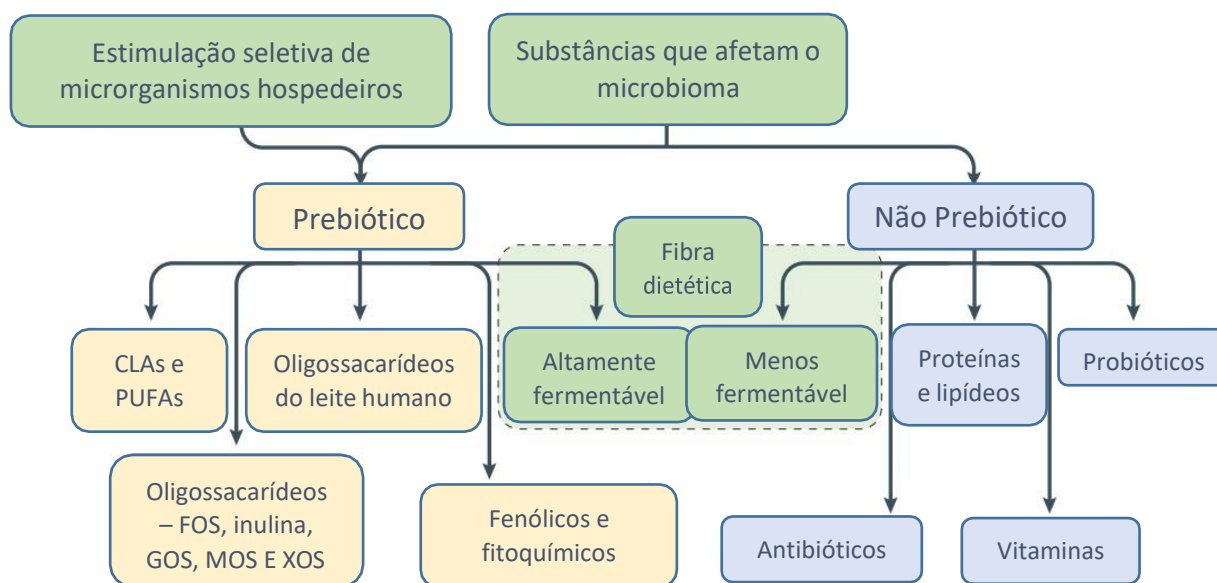
A maior parte dos primeiros prebióticos avaliados em humanos e utilizados comercialmente demonstraram estimular especificamente *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, assim o termo "seletivamente" foi interpretado como se referindo principalmente a esses dois gêneros de bactérias probióticas, sendo a estimulação específica de bifidobactérias - efeito bifidogênico - considerada um dos principais efeitos de prebióticos. No entanto, uma vez que a pesquisa inicial sobre ecologia microbiana intestinal era baseada em métodos convencionais, dependentes de cultivo, os dados obtidos eram insuficientes para revelar a complexidade das alterações microbianas induzidas por prebióticos. Métodos moleculares, que desde 2005 identificam uma maior gama de membros da microbiota intestinal, permitiram a apreciação de mais gêneros bacterianos que podem utilizar alguns substratos prebióticos (FEENEY; SLEATOR, 2012; GIBSON et al., 2017).

Nesse sentido, a Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP) propôs recentemente a definição de prebiótico como “um substrato que é utilizado seletivamente por microrganismos hospedeiros conferindo um benefício de saúde”. Este novo termo esclarece que alvos prebióticos se estendem além da estimulação apenas de bifidobactérias e lactobacilos e reconhece que os benefícios à saúde podem derivar do impacto sobre outros grupos microbianos benéficos incluindo, mas não se limitando a, *Roseburia*, *Akkermansia*, *Eubacterium* ou *Faecalibacterium* spp. (HUTKINS et al., 2016; GIBSON et al., 2017).

Apesar de os prebióticos não serem as únicas substâncias que podem afetar a microbiota, o critério de estimulação seletiva distingue os prebióticos de muitas outras substâncias. Por esse motivo, os prebióticos diferem da maioria das fibras alimentares, como as pectinas e celulose, visto que estimulam o crescimento de uma variedade de microrganismos intestinais (Figura 3). Um prebiótico deve, no mínimo, ser resistente à digestão do hospedeiro

(por exemplo, acidez gástrica, hidrólise por enzimas e absorção gastrointestinal), ser altamente fermentável pelos microrganismos intestinais e estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias intestinais associadas à saúde e bem-estar (PANDEY; NAIK; VAKIL, 2015).

**Figura 3.** Distinção do que é considerado um prebiótico ou não.



**Fonte:** Adaptado de Gibson et al. (2017). CLA: ácido linoléico conjugado; PUFA: ácidos graxos poli-insaturados; FOS: fruto-oligossacarídeos; GOS: galacto-oligossacarídeos; MOS: manano-oligossacarídeos; XOS: xilo-oligossacarídeos.

Vários carboidratos fermentáveis têm sido alvo de investigação e conferem um efeito prebiótico, no entanto, os prebióticos dietéticos mais documentados por conferir benefícios à saúde em humanos são os oligossacarídeos não digeríveis frutanos (fruto-oligossacarídeos (FOS) e inulina) e galactanos (galacto-oligossacarídeos (GOS)) (RASTALL; GIBSON, 2015).

Estes oligossacarídeos são preferencialmente metabolizados por bifidobactérias, devido ao fato de que as ligações glicosídicas de FOS e GOS são facilmente degradadas pelas enzimas  $\beta$ -frutanosidase e  $\beta$ -galactosidase, respectivamente, as quais são predominantes no gênero *Bifidobacterium* (SARBINI; RASTALL, 2011). Dessa forma, devido às suas reconhecidas propriedades prebióticas, principalmente essa estimulação seletiva de bifidobactérias no cólon, FOS e GOS dominam a categoria de prebióticos, sendo os mais estudados e utilizados no desenvolvimento de novos produtos alimentícios (GIBSON et al., 2017).

Embora os prebióticos atualmente estabelecidos sejam carboidratos não-digeríveis, outras substâncias são candidatas a prebióticos. Nesse grupo, polifenóis vegetais constituem uma classe de compostos que pode atender aos critérios de prebióticos, uma vez que os benefícios à saúde associados dependem da utilização microbiana e dos metabólitos produzidos (DUENAS et al., 2015). Oligossacarídeos do leite humano, além do estímulo de bactérias benéficas, podem também conferir efeitos à saúde que são independentes da sua fermentação (como proteção de infecções de bebês por meio da inibição da aderência de patógenos às células epiteliais que revestem o TGI) (KULINICH; LIU, 2016). Além disso, embora a maioria dos prebióticos atuais seja administrada por via oral, eles também podem ser administrados diretamente a outros locais do corpo colonizados por microrganismos, como o trato vaginal e a pele (GIBSON et al., 2017).

Visto que o mecanismo benéfico pode ser mediado por produtos metabólicos microbianos, tanto as alterações da microbiota quanto os metabólitos devem ser investigados, juntamente com os resultados de saúde. Assim, os resultados metabólicos da utilização seletiva de um probiótico são fundamentais para o estabelecimento dos efeitos benéficos. Nesse contexto, já é bem estabelecido que os principais produtos do metabolismo dos prebióticos são os AGCC, metabólitos que influenciam vários aspectos da fisiologia do hospedeiro (KOH et al., 2016).

Os efeitos à saúde conferidos pelos prebióticos estão evoluindo, mas atualmente incluem benefícios para o TGI (por exemplo, inibição de bactérias patogênicas, estimulação imunológica) (DRAKOULARAKOU et al., 2010; VULEVIC et al., 2015), cardio-metabolismo (por exemplo, redução dos níveis lipídicos no sangue, efeitos sobre a resistência à insulina) (BARENGOLTS, 2016), saúde mental (por exemplo, metabólitos que influenciam a função cerebral, energia e cognição) (SHERWIN et al., 2016) e saúde óssea (por exemplo, biodisponibilidade mineral) (McCABE; BRITTON; PARAMESWARAN, 2015), entre outros. Dentre esses, os mais explorados são os potenciais benefícios para a homeostase da glicose e perfil lipídico por meio de mecanismos como armazenamento e gastos de energia a partir da dieta, balanço hormonal da saciedade, regulação da síntese lipídica e melhoria da resistência à insulina e função imunológica (BESERRA et al., 2015).

### 1.3.1 Simbióticos

Quando Gibson e Roberfroid introduziram o conceito de prebióticos, os dois especularam quanto aos benefícios adicionais caso os prebióticos fossem combinados com

probióticos para formar o que eles denominaram de ‘simbióticos’. Dessa forma, o termo foi inicialmente definido como “misturas de probióticos e prebióticos que afetam benéficamente o hospedeiro por melhorar a sobrevivência e implantação de suplementos alimentares microbianos vivos no TGI, estimulando seletivamente o crescimento e/ou ativando o metabolismo de um ou um número limitado de bactérias promotoras de saúde, melhorando assim o bem-estar do hospedeiro” (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Desde a primeira introdução desse conceito, o termo não foi redefinido.

Nesse sentido, com base nesta definição, existem dois tipos de abordagens simbióticas: (1) *Complementar*, o probiótico é escolhido com base nos efeitos benéficos específicos desejados no hospedeiro, e o prebiótico é escolhido de forma independente para aumentar seletivamente as concentrações de espécies benéficas da microbiota. O prebiótico pode promover a multiplicação e atividade do probiótico, mas seria de forma indireta. (2) *Sinérgica*, o probiótico é novamente escolhido com base nos efeitos benéficos específicos sobre o hospedeiro, mas o prebiótico é escolhido para estimular especificamente o crescimento e a atividade do microrganismo probiótico. Nessa abordagem, o prebiótico é selecionado para ter uma maior afinidade com o probiótico e é escolhido para melhorar a sua sobrevivência e multiplicação no hospedeiro. O prebiótico pode também aumentar os níveis de grupos benéficos no TGI, mas o alvo primário é o probiótico ingerido (KOLIDA; GIBSON, 2010).

As linhagens probióticas mais utilizadas em formulações simbióticas incluem espécies de lactobacilos e bifidobactérias, assim como *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus coagulans*, enquanto os principais prebióticos compreendem oligossacarídeos como FOS, GOS e xilo-oligossacarídeos (XOS), inulina e prebióticos derivados de fontes naturais como raízes de chicória e yacon (PANDEY; NAIK; VAKIL, 2015).

É importante ressaltar que o desenvolvimento de combinações simbióticas clinicamente eficazes constitui um desafio, visto que vários requisitos devem ser atendidos, tais como: determinação de doses efetivas mínimas de cada componente; inclusão de controles adequados (além de controles padrão com placebo, os controles somente com probióticos e prebióticos podem também ser necessários para confirmar efeitos aditivos ou sinérgicos); justificativa de como o pro- e prebiótico foram selecionados e combinados, entre outros (KRUMBECK; WALTER; HUTKINS, 2018).

Vários desafios são envolvidos também na avaliação de estudos clínicos simbióticos. Tal como acontece com outros estudos com pro- ou prebióticos, as doses, duração do tratamento, populações-alvo e as medidas dos efeitos do tratamento são muitas vezes diferentes, e todos esses fatores podem afetar os resultados do tratamento avaliado (MUGAMBI

et al., 2013). De acordo com Krumbeck, Walter e Hutkins (2018), embora existam muitas publicações sobre simbióticos (mais de 140 apenas no ano de 2016), a literatura revela poucas evidências de sinergismo entre pro- e prebióticos utilizados em estudos em humanos. Em muitos casos, foram utilizadas linhagens probióticas que podem não ter utilizado o respectivo prebiótico. Mesmo quando as seleções *in vitro* ou *in situ* de combinações simbióticas são aplicadas, essas técnicas não levam em conta os fatores ecológicos que afetarão a linhagem probiótica *in vivo*, nem como outros membros autóctones da microbiota intestinal podem competir com o probiótico pelo substrato prebiótico.

Ainda assim, algumas revisões e meta-análises descrevem efeitos benéficos associados ao consumo de simbióticos, tais como equilíbrio da microbiota intestinal, redução de infecções, e melhoria da função hepática, parâmetros lipídicos e resposta imune (FORD et al., 2014; BESERRA et al., 2015; PANDEY; NAIK; VAKIL, 2015; KASATPIBAL et al., 2017). Apesar das muitas alegações de saúde serem relatadas na literatura e haver um grande apelo no mercado comercial, nenhuma alegação foi aprovada por agências reguladoras no Brasil, Estados Unidos ou Europa.

#### 1.4 METABONÔMICA

A ideia de que fluidos biológicos refletem a saúde do indivíduo é antiga. Na Antiguidade, chineses utilizavam formigas para avaliar se a urina do paciente continha níveis elevados de glicose e, portanto, detectar diabetes. Na Idade Média, características como cor, sabor e odor da urina eram utilizados na identificação de diversas condições clínicas (LINDON; NICHOLSON, 2008). No entanto, o conceito de que indivíduos possuem um "perfil metabólico" (termo cunhado por Hornings em 1971), o qual é refletido na composição de seus biofluidos foi introduzido no início dos anos 50 por Roger Williams e colaboradores, quando estes utilizaram cromatografia em papel para sugerir padrões metabólicos característicos na urina e saliva associados com doenças como a esquizofrenia (FAN; LANE, 2016).

Nesse contexto, a metabonômica, do grego, *meta* -mudança e *nomos* - regras ou leis, foi definida em 1999, como modelos quimiométricos que têm a capacidade de classificar mudanças no metabolismo (NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999). Em 2001, foi também introduzido o termo metabolômica, inclusive, usado como sinônimo em alguns trabalhos, mas, por definição, abordagens diferentes. Enquanto a metabolômica é definida como a análise qualitativa e quantitativa de todos os metabólitos de um sistema (ROBERTSON, 2005), a

metabonômica procura a impressão digital de uma perturbação e a partir dela, busca identificar a quais metabólitos endógenos está relacionada (NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999).

De maneira geral, os metabólitos são definidos como moléculas com massa molar menor que 1 kDa presentes nos organismos, no entanto, macromoléculas como lipoproteínas podem também ser consideradas metabólitos (LINDON; NICHOLSON, 2008). Em humanos, os metabólitos são comumente classificados como endógenos (produzidos pelo próprio organismo) ou exógenos e podem ser citados peptídeos, lipídios, ácidos graxos, aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos, ácidos orgânicos, amins biogênicas, vitaminas, minerais, aditivos alimentares, drogas, cosméticos, contaminantes, poluentes e qualquer outro produto químico que os humanos ingerem, metabolizam, catabolizam ou entram em contato (WISHART et al., 2018).

Uma importante fonte de metabólitos intestinais é oriunda das transformações de nutrientes da dieta tanto pelo hospedeiro quanto por sua microbiota (VERNOCCHI, et al., 2012). De maneira geral, a microbiota intestinal metaboliza a entrada de substratos a partir do hospedeiro, incluindo dieta e xenobióticos, em metabólitos que podem entrar na corrente sanguínea do hospedeiro e afetá-lo em sua saúde. Por exemplo, fármacos terapêuticos podem ser inativados ou convertidos em outros derivados com possíveis efeitos tóxicos. Dessa forma, mudanças nos substratos que entram no organismo, tais como probióticos, mudam o reservatório de substratos microbianos disponíveis e alteram o perfil de metabólitos do intestino, produzindo efeitos variáveis sobre o hospedeiro (URSELL et al., 2014).

#### 1.4.1 Aplicação da Metabonômica na Ciência de Probióticos

A metabonômica baseia-se no princípio de homeostase, uma vez que busca estabelecer uma correlação entre o status bioquímico antes e depois de determinado estímulo externo, ou seja, em um estado de doença ou ação/intervenção que promova uma alteração no estado de equilíbrio do sistema em análise (NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999).

Tem sido demonstrado que o metaboloma (conjunto completo de metabólitos de um sistema) (MARKLEY et al., 2017) pode refletir estados fisiológicos e/ou patológicos. Por exemplo, estudos recentes têm descrito assinaturas metabólicas associadas à obesidade, incluindo altos níveis de aminoácidos (de cadeia ramificada e aromática), bem como glicerol e glicerofosfolinas (HO et al., 2016; MENNI et al., 2017; PIENING et al., 2018). Acredita-se que a perturbação no metabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada em indivíduos obesos

e naqueles com resistência à insulina esteja relacionada a diferenças no catabolismo de aminoácidos no tecido adiposo (MENNI et al., 2017).

Cirulli e colaboradores (2018) igualmente, destacaram uma profunda perturbação do metaboloma na obesidade e identificaram uma assinatura do metaboloma que pode ser útil para examinar a saúde metabólica sem as limitações das medidas antropométricas (tais como IMC) ou do custo e tempo que os equipamentos de imagem requerem.

De acordo com Neeland, Poirier e Despre's (2018), essa caracterização dos metabólitos associados ao sobrepeso e obesidade pode fornecer informações sobre os mecanismos que levam a essa doença e consequências associadas. A avaliação longitudinal do ganho de peso ao longo do tempo poderia então indicar se há alterações metabólicas que causam obesidade – ou seja, se os níveis atuais de metabólitos podem prever mudanças futuras de peso - ou se todas as alterações metabólicas associadas à obesidade são consequência de mudanças de peso. Na prática, as perturbações do metaboloma geralmente aparecem como consequência de alterações no peso ao invés de ser um fator contribuinte, ou seja, os níveis de metabólitos não fornecem poder preditivo para futuras mudanças de peso (CIRULLI et al., 2018).

Já na pesquisa nutricional, a metabonômica é uma ferramenta biológica poderosa no estudo da complexa relação entre a intervenção nutricional e o metabolismo, uma vez que pode fornecer o ponto final das consequências de uma intervenção, além de permitir a compreensão de como os metabólicos são impactados por diferentes intervenções (WANG et al., 2018).

Os produtos gerados pelo metabolismo das bactérias que compõem a microbiota e seu papel na manutenção da saúde e tratamento de doenças crônicas, utilizando como mecanismo a alteração da dieta, são um dos alvos de pesquisas recentes, como por exemplo no que se refere ao impacto do uso de linhagens probióticas na alimentação (WANG et al., 2018).

Já é bem estabelecido que os probióticos podem interagir com os microrganismos intestinais do hospedeiro e induzir mudanças na composição da microbiota que são benéficas à saúde. No entanto, uma vez que os microrganismos intestinais diferem acentuadamente entre os indivíduos, os perfis de metabólitos que eles produzem podem ser altamente variáveis (CHUNG et al., 2018). Nesse contexto, a metabonômica demonstra ser uma ferramenta útil para uma melhor compreensão dos efeitos de uma terapia probiótica.

Diversos estudos utilizaram as abordagens metabonômica/metabolômica, em humanos e animais, para avaliar as relações entre o consumo de probióticos e condições como doença inflamatória intestinal (DII) (HONG et al., 2010; HONG et al., 2011; PEDERSEN et al., 2011), doença hepática (SHI et al., 2015), doença hepática gordurosa não alcoólica

(DHGNA) (MICCHELI et al., 2015), cirrose (BAJAJ et al., 2014), envelhecimento (BRASIL I et al., 2013), mastite (VAZQUEZ-FRESNO et al., 2014) e obesidade (KIM et al., 2017). Em suma, os resultados desses trabalhos demonstraram que o consumo de probióticos pode influenciar os metabólitos em biofluidos, tecidos e órgãos humanos, por meio da alteração de AGCC, aminoácidos e ácidos orgânicos, os quais são importantes para funções fisiológicas básicas no corpo humano.

Na pesquisa de Kim e colaboradores (2017), o efeito dos probióticos na perda de peso foi investigado em 66 indivíduos obesos que consumiram *Lactobacillus curvatus* HY7601 e *Lactobacillus plantarum* KY1032. Os soros dos indivíduos foram analisados por UPLC-MS e foram detectados níveis significativamente aumentados de octenoilcarnitina (C8:1), tetradecenoilcarnitina (C14:1), decanoilcarnitina (C10) e dodecenoilcarnitina (C12:1) após consumo dos probióticos. Foi sugerido então que o consumo dos probióticos poderia reduzir o peso e a adiposidade aumentando as acilcarnitinas de cadeia média. Ahn e colaboradores (2015), também haviam constatado que o consumo das duas linhagens HY7601 e KY1032 poderia reduzir o risco de doenças cardíacas ao diminuir o nível de triglicerídeos em pacientes com hipertrigliceridemia. Esses dois lactobacilos poderiam, dessa forma, exercer efeitos benéficos sobre a obesidade e a síndrome metabólica. No entanto, até o momento, não se tem conhecimento do estudo de bifidobactérias e seus possíveis impactos no plasma sanguíneo de indivíduos com sobrepeso.

#### 1.4.2 Ressonância Magnética Nuclear na Metabonômica

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica espectroscópica, ou seja, se baseia na interação entre a radiação eletromagnética e a matéria. Em particular, a RMN de hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ) é utilizada na metabonômica devido ao seu alto desempenho, uma vez que um grande número de metabólitos contém átomos de hidrogênio (FAN; LANE, 2016).

Dessa forma, embora a espectroscopia de RMN seja teoricamente complexa, a peculiaridade da RMN de  $^1\text{H}$ , entre outros métodos espectroscópicos, baseia-se em sua capacidade de detectar simultaneamente, mesmo em estruturas biológicas complexas, todas as moléculas que contêm átomos de hidrogênio e associar diretamente as intensidades de cada pico ao número de hidrogênios implícitos àquele sinal (SCANO et al., 2019).

Desde a descoberta do fenômeno da RMN em sólidos e líquidos (BLOCH, 1946; PURCELL; TORREY; POUND, 1946) e do estudo pioneiro de Seeley e colaboradores (1976) que utilizaram a técnica na determinação de metabólitos em amostras biológicas, a

espectroscopia de RMN tem provado ser uma ferramenta poderosa na elucidação da estrutura de substâncias químicas orgânicas, seguida de determinação estrutural e dinâmica de macromoléculas e, mais recentemente, determinação e quantificação de metabólitos no campo da metabonômica/metabolômica (FAN; LANE, 2016).

De fato, as abordagens analíticas mais utilizadas na análise do metaboloma em amostras biológicas são a Espectroscopia de RMN e a Espectrometria de Massas (EM), devido à capacidade das duas técnicas de detectar centenas de metabólitos em uma única medida. Na literatura, a metabolômica foi inicialmente empregada por cientistas que estudavam plantas, habituados a utilizar EM; por sua vez, a metabonômica foi empregada pelo grupo do *Imperial College of London*, que quase exclusivamente utilizava espectroscopia de RMN em seus trabalhos. No entanto, há casos do uso inverso (ROBERTSON, 2005).

Embora ofuscada atualmente pela MS em termos de número de compostos resolvidos, a espectroscopia de RMN oferece vantagens quando utilizada sozinha e também acoplada à MS (MARKLEY et al., 2017). Entre as vantagens e características, podem ser citadas: (1) A RMN é altamente reprodutível e quantitativa; uma única referência interna é suficiente para a quantificação absoluta de metabólitos; (2) Uma combinação de técnicas de RMN permite a identificação inequívoca de estruturas de metabólitos desconhecidos, o que é importante considerando que a maioria dos metabólitos detectados em misturas biológicas complexas é desconhecida; (3) A RMN possibilita a análise de biofluidos e tecidos intactos, sem necessidade de separação ou preparação de amostras, o que representa uma grande vantagem, uma vez que fatores associados à preparação e separação de amostras contribuem para a variabilidade analítica e representam um grande “gargalo”; (4) a RMN não é destrutiva, o que significa que a amostra permanece intacta após a análise e pode ser usada para reanálise ou análise usando outros métodos como a EM; (5) A RMN possui capacidade inigualável de rastrear vias metabólicas e medir fluxos metabólicos utilizando substratos marcados com isótopos; (6) A RMN oferece oportunidades únicas para traduzir as descobertas *in vitro* para aplicações clínicas *in vivo*; (7) A RMN oferece vantagens para compostos que são difíceis de ionizar ou requerem derivatização para EM, além de permitir a identificação de compostos com massas idênticas; e, finalmente, (8) os perfis de metabólitos obtidos por RMN são virtualmente independentes do operador e do instrumento utilizado, o que proporciona um alto grau de confiabilidade aos resultados derivados (GOWDA, RAFTERY, 2015; MARKLEY et al., 2017).

No entanto, apesar das muitas características benéficas para uso na metabolômica, a resolução limitada e a baixa sensibilidade da RMN, juntamente com as

dificuldades associadas à identificação de metabólitos desconhecidos (particularmente os de baixa concentração), representam um grande desafio para desvendar a complexidade das misturas biológicas. Por exemplo, o número de metabólitos detectáveis por RMN em uma amostra de plasma sanguíneo ou soro é restrito a 30 (ou menos), o que é muito menor do que o número real de metabólitos no sangue (GOWDA, RAFTERY, 2015). Ainda assim, a RMN é amplamente empregada na metabonômica/metabolômica ao fornecer uma “janela” para observar e quantificar os compostos mais abundantes presentes em fluidos biológicos.

Concomitante ao desenvolvimento dessas abordagens, tornou-se necessário o desenvolvimento de bancos de dados metabolômicos. Em 2007, o primeiro esboço do metaboloma humano foi completo. Cientistas canadenses catalogaram na época cerca de 2200 metabólitos encontrados no corpo humano e com isso foi criado o *The Human Metabolome Database* (HMDB). Nos últimos 10 anos, o HMDB tornou-se a maior e mais abrangente "base de dados" metabolômica do mundo com mais de 100 mil metabólitos descritos, sendo considerado um dos principais recursos para estudos metabólicos humanos (WISHART et al., 2018), entre outros como *DrugBank*, *The PubChem Project* (PubChem), *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEEG) e *Chemical Entities of Biological Interest* (ChEBI).

Por fim, salienta-se que, para obter informações com boa reprodutibilidade, os parâmetros experimentais devem ser ajustados e a quimiometria, definida como aplicação de métodos estatísticos ou matemáticos em dados químicos, deve ser utilizada como ferramenta de auxílio. Em virtude da grande quantidade de dados obtidos a partir dos espectros de RMN, de difícil interpretação visual, faz-se necessário a aplicação apropriada de técnicas de análise univariada e multivariada para extração de informações relevantes dos dados e a fim de fornecer conhecimento biológico sobre o problema estudado (SACCENTI et al., 2014).

Nas análises multivariadas, a classificação e discriminação de metabólitos responsáveis por diferenciar os grupos de amostras são realizadas por meio da avaliação do conjunto da matriz dos dados extraídos. De maneira geral, são aplicados métodos não supervisionados, como análise de componentes principais (PCA, do inglês, *principal component analysis*), e métodos supervisionados, como análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês, *partial least squares discriminant analysis*), e projeções ortogonais para estruturas latentes (OPLS-DA, do inglês, *orthogonal partial least squares discriminant analysis*) (SACCENTI et al., 2014). A partir dos resultados das análises de PLS-DA, a identificação dos compostos pode ser realizada por meio da pesquisa em bancos de dados metabolômicos e/ou comparação com a literatura existente.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, C. A. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, p. 37–46, 2010.
- AGERHOLM-LARSEN, L.; RABEN, A.; HAULRIK, N. et al. Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, p. 288-97, 2000.
- AHMED, M., PRASAD, J., GILL, H. S., STEVENSON, L., GOPAL, P. K. Impact of consumption of different levels of *Bifidobacterium lactis* HN019 on the intestinal microflora of elderly human subjects. **Journal Nutrition Health Aging**, v. 11, n. 1, p. 26-31, 2007.
- AHN, H. Y.; KIM, M.; CHAE, J. S. et al. Supplementation with two probiotic strains, *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032, reduces fasting triglycerides and enhances apolipoprotein A-V levels in non-diabetic subjects with hypertriglyceridemia. **Atherosclerosis**, v. 241, p. 649–656, 2015.
- ALVARO, E.; ANDRIEUX, C.; VIOLAINE, R. et al. Composition and metabolism of the intestinal microbiota in consumers and non-consumers of yogurt. **British Journal of Nutrition**, v. 97, p. 126–133, 2007.
- AMAR, J.; CHABO, C.; WAGET, A. et al. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. **EMBO Molecular Medicine**, v. 3, n. 9, p. 559-72, 2011.
- ARUNACHALAM, K.; GILL, H.; CHANDRA, R. K. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* HN019. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, n. 3, p. 263-267, 2000.
- ASEMI, Z.; ZARE, Z.; SHAKERI, H. et al. Effect of multispecies probiotic supplements on metabolic profiles, hs-CRP, and oxidative stress in patients with type 2 diabetes. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 63, p. 1-9, 2013.
- ATAIE-JAFARI, A.; LARIJANI, B.; ALAVI MAJD, H.; TAHBAZ, F. Cholesterol-lowering effect of probiotic yogurt in comparison with ordinary yogurt in mildly to moderately hypercholesterolemic subjects. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 54, p. 22-27, 2009.
- BÄCKHED, F.; LEY, R. E.; SONNENBURG, J. L.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**, v. 307. p. 1915-1919, 2005.
- BÄCKHED, F.; MANCHESTER, J. K.; SEMENKOVICH, C. F. et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 979-84, 2007.
- BAJAJ, J. S.; HEUMAN, D. M.; HYLEMON, P. B. et al. Randomised clinical trial: *Lactobacillus* GG modulates gut microbiome, metabolome and endotoxemia in patients with cirrhosis. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 39, p. 1113–1125, 2014.

BARENGOLTS, E. Gut microbiota, prebiotics, probiotics, and synbiotics in management of obesity and prediabetes: review of randomized controlled trials. **Endocrine Practice**, v. 22, n. 10, p. 1224–1234, 2016.

BARRETO, F. M.; SIMÃO, A. C.; MORIMOTO, H. K.; LOZOVOY, M. B.; DICHI, I.; MIGLIORANZA, L. H. S. Beneficial effects of *Lactobacillus plantarum* on glycemia and homocysteine levels in postmenopausal women with metabolic syndrome: a pilot study. **Nutrition**, v. 30, n.7, p. 939-942, 2014.

BERNINI, L. J.; SIMÃO, A. N.; ALFIERI, D. F. et al. Beneficial effects of *Bifidobacterium lactis* on lipid profile and cytokines in patients with metabolic syndrome: a randomized trial. Effects of probiotics on metabolic syndrome. **Nutrition**, v. 32, n. 6, p. 716-719, 2016.

BERTAZZONI, E.; DONELLI, G.; MIDTVEDT, T.; NICOLI, J.; SANZ, Y. Probiotics and clinical effects: is the number what counts? **Journal of Chemotherapy**, v. 25, n. 4, p. 193-212, 2013.

BESERRA, B. T. S.; FERNANDES, R., DO ROSARIO, V. A., MOCELLIN, M. C., KUNTZ, M. G., TRINDADE, E. B. A systematic review and meta-analysis of the prebiotics and synbiotics effects on glycemia, insulin concentrations and lipid parameters in adult patients with overweight or obesity. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 5, p. 845–858, 2015.

BEVINS, C. L.; SALZMAN, N. H. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 356-368, 2011.

BLOCH, F. Nuclear Induction. **Physical Review**, v. 70, n. 7-8, p. 460-474, 1946.

BOAVENTURA, C.; AZEVEDO, R.; UETANABARO, A.; NICOLI, J.; BRAGA, L. G. The benefits of probiotics in human and animal nutrition. In: BRZOZOWSKI, T. **New Advances in the Basic and Clinical Gastroenterology**, Croatia: InTech, 2012, p. 75-100.

BOGSAN, C.; FERREIRA, L.; MALDONADO, C.; PERDIGON, G.; ALMEIDA, S.; OLIVEIRA, M. Fermented or unfermented milk using *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019: Technological approach determines the probiotic modulation of mucosal cellular immunity. **Food Research International**, v. 64, p. 283-288, 2014.

BOMBELLI, M.; FACCHETTI, R.; FODRI, D. et al. Impact of body mass index and waistcircumference on the cardiovascularrisk and all-cause death in a generalpopulation: Data from the PAMELA study. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 23, p. 650-656, 2013.

BOTTAZI, V. Food and feed production with microorganisms. **Biotechnology**, v. 5, p. 315-363, 1983.

BOTTACINI, F.; VENTURA, M.; VAN SINDEREN, D.; O'CONNELL MOTHERWAY, M. Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. **Microbial Cell Factories**, v. 13, Suppl 1:S4, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. Disponível em: <[http://www.aladi.org/nsfaladi/normasTecnicas.nsf/09267198f1324b64032574960062343c/4207980b27b39cf903257a0d0045429a/\\$FILE/IN%20N%C2%BA%2046-2007.pdf](http://www.aladi.org/nsfaladi/normasTecnicas.nsf/09267198f1324b64032574960062343c/4207980b27b39cf903257a0d0045429a/$FILE/IN%20N%C2%BA%2046-2007.pdf)>. Acesso em: 24 jan 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução, RDC nº 241, de 26 de julho de 2018. **Requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC\\_241\\_2018\\_.pdf/941cda52-0657-46dd-af4b-47b4ee4335b7](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC_241_2018_.pdf/941cda52-0657-46dd-af4b-47b4ee4335b7)>. Acesso em: 26 nov 2018.

BRASIL, E.; MENGHERI, E.; TOMASSINI, A. et al. *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 induce different age-related metabolic profiles revealed by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy in urine and feces of mice. **The Journal of Nutrition**, v. 143, p. 1549–1557, 2013.

BRAVO, J. A.; FORSYTHE, P.; CHEWB, M. V.; ESCARAVAGE, E.; SAVIGNAC, H. M.; DINAN, T. G.; BIENENSTOCK, J.; CRYAN, J. F. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 38, p. 16050–16055, set. 2011.

BRIGIDI, P.; VITALI, B.; SWENNEN, E. et al. Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. **Research in Microbiology**, v. 152, n. 8, p. 735–741, 2001.

CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 6, p. 737-743, 2009.

CARDING.; VERBEKE, K.; VIPOND, D. T.; CORFE, B. M.; OWEN, L. J. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 26, 26191, 2015.

CHANG, B. J.; PARK, S. U.; JANG, Y. S. et al. Effect of functional yogurt NY-YP901 in improving the trait of metabolic syndrome. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, p. 1250-5, 2011.

CHENOLL, E.; CASINOS, B.; BATALLER E. et al. Novel probiotic *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 strain active against the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1335-43, 2011.

CHIANG, B.; SHEIH, Y.; WANG, L., LIAO, C., GILL, H. Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimisation and definition of cellular immune responses. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, n.11, p. 849-855, 2000.

CHUNG, W. S.; WALKER, A. W.; LOUIS, P. et al. Modulation of the human gut microbiota by dietary fibres occurs at the species level. **BMC Biology**, v. 14, n. 3, 2016.

CHUNG, H.; SIM, J.; MIN, T.; CHOI, H. Metabolomics and lipidomics approaches in the science of probiotics: a review. **Journal of Medicinal Food**, v. 21, n. 11, p. 1086-1095, 2018.

CIRULLI, E. T.; GUO, L.; LEON SWISHER, C.; SHAH, N.; HUANG, L., NAPIER, L. A. et al. Profound perturbation of the metabolome in obesity is associated with health risk. **Cell Metabolism**, v. 29, S1550-4131, 2018.

CLAESSON, M. J.; CUSACK, S.; O'SULLIVAN, O. et al. Composition, variability and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 4586-4591, 2011.

CLEMENTE, J. C.; URSELL, L. K.; PARFREY, L. W.; KNIGHT, R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. **Cell**, v. 148, p. 1258-1270, 2012.

CONROY, K. P.; DAVIDSON, I. M.; WARNOCK, M. Pathogenic obesity and nutraceuticals. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 70, p. 426-438, 2011.

COSTA, G. N.; MIGLIORANZA, L. H. S. Probiotics: The effects on human health and current prospects. In: RIGOBELLO, E. C. **Probiotics**. Croatia: InTech, 2012. p. 367-380.

DAVID, L. A.; MAURICE, C. F.; CARMODY, R. N. et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, v. 505, p. 559-563, 2014.

DE FILIPPIS, F.; PELLEGRINI, N.; VANNINI, L.; JEFFERY, I. B.; LA STORIA, A.; LAGHI, L.; SERRAZANETTI D. I.; DI CAGNO, R.; FERROCINO, I.; LAZZI, C.; TURRONI, S.; COCOLIN, L.; BRIGIDI, P.; NEVIANI, E.; GOBBETTI, M.; O'TOOLE, P. W.; ERCOLINI, D. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. **Gut**, n. 65, n. 11, p. 1812-1821, 2016.

DE FILIPPO, C.; CAVALIERI, D.; DI PAOLA, M.; RAMAZZOTTI, M.; POULLET, J. B.; MASSART, S.; COLLINI, S.; PIERACCINIE, G.; LIONETTI, P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 33, p. 14691-14696, 2010.

DELZENNE, N. M.; CANI, P. D. Interaction Between Obesity and the Gut Microbiota: Relevance in Nutrition. **Annual Review of Nutrition**, v. 31, p. 15-31, 2011.

DEN BESTEN, G.; VAN EUNEN, K.; GROEN, A. K.; VENEMA, K.; REIJNGOUD, D. J.; BAKKER, B. M. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **The Journal of Lipid Research**, v. 54, 232540, 2013.

DERRIEN, M.; HYLCKAMA, V.; Vlieg, J. E. Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 6, p. 354-366, 2015.

DESBONNET, L.; GARRETT, L.; CLARKE, G.; BIENENSTOCK, J.; DINAN, T. G. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: an assessment of potential antidepressant properties in the rat. **Journal of Psychiatric Research**, v. 43, n. 2, p. 164-174, 2008.

DETHLEFSEN, L.; MCFALL-NGAI, M.; RELMAN, D. A. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. **Nature**, v. 449, p. 811-818, 2007.

DINAN, T. G.; STANTON, C.; CRYAN, J. F. Psychobiotics: a novel class of psychotropic. **Biological Psychiatry**, v. 74, n. 10, p. 720-726, 2013.

DOMINGUEZ-BELLO, M. G.; COSTELLO, E. K.; CONTRERAS, M.; MAGRIS, M.; HIDALGO, G.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 26, p. 11971-11975, 2010.

DONG, P.; YANG, Y.; WANG, W. The role of intestinal bifidobacteria on immune system development in young rats. **Early Human Development**, v. 86, n. 1, p. 51–58, 2010.

DRAKOULARAKOU, A.; TZORTZIS, G.; RASTALL, R. A.; GIBSON, G. R. A double-blind, placebo-controlled, randomized human study assessing the capacity of a novel galacto-oligosaccharide mixture in reducing travellers' diarrhoea. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, n. 2, p. 146–152, 2010.

DUENAS, M.; MUÑOZ-GONZÁLEZ, I.; CUEVA, C.; JIMÉNEZ-GIRÓN, A.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; SANTOS-BUELGA, C.; MORENO-ARRIBAS, M. V.; BARTOLOMÉ, B. A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols. **BioMed Research International**, v. 2015, ID 850902, 2015.

DUNCAN, S. H.; LOBLEY, G. E.; HOLTROP, G.; INCE, J.; JOHNSTONE, A. M.; LOUIS, P.; FLINT, H. J. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. **International Journal of Obesity**, v. 32, p. 1720-1724, 2008.

DUPONT, A. W.; DUPONT, H. L. The intestinal microbiota and chronic disorders of the gut. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 8, p. 523-531, 2011.

ECKBURG, P. B.; BIK, E. M.; BERNSTEINS, C. N.; PURDON, E.; DETHLEFSEN, L.; SARGENT, M.; GILL, S. R.; NELSON, K. E.; RELMAN, D. A. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, 2005.

EJTAHED, H. S.; MOHTADI-NIA, J.; HOMAYOUNI-RAD, A. et al. Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 3288-94, 2011.

EUTAMENE, H.; LAMINE, F.; CHABO, C.; THEODOROU, V.; ROCHAT, F.; BERGONZELLI, G. E.; CORTHÉSY-THEULAZ, I.; FIORAMONTI, J.; BUENO, L. Synergy between *Lactobacillus paracasei* and its bacterial products to counteract stress-induced gut permeability and sensitivity increase in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 08, p. 1901-1907, 2007.

FAN, T. W.; LANE, A. N. Applications of NMR spectroscopy to systems biochemistry. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 92-93, p. 18-53, 2016.

FAVIER, C. F.; VAUGHAN, E. E.; DE VOS, W. M.; AKKERMANS, A. D. L. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 219–226, 2002.

FEENEY, A.; SLEATOR, R. D. The human gut microbiome: the ghost in the machine. **Future Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1235-1237, 2012.

FERROCINO, I.; DI CAGNO, R.; DE ANGELIS, M.; TURRONI, S.; VANNINI, L.; BANCALARI, E.; RANTSIOU, K.; CARDINALI, G.; NEVIANI, E.; COCOLIN, L. Fecal microbiota in healthy subjects following omni-vore, vegetarian and vegan diets: culturable populations and rRNA DGGE profiling. **PLoS One**, v. 10, e0128669, 2015.

FLEISSNER, C. K.; HUEBEL, N.; ABD EL-BARY, M. M. et al. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. **British Journal of Nutrition**, v. 104, p. 919–29, 2010.

FLINT, H. J.; DUNCAN, S. H.; SCOTT, K. P.; LOUIS, P. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 74, n. 1, p. 13-22, 2015.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). **Report of a Joint FAO-WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Cordoba, Argentina, 2001

FORD, A. C.; QUIGLEY, E. M.; LACY, B. E.; LEMBO, A. J.; SAITO, Y. A.; SCHILLER, L. R.; SOFFER, E. E.; SPIEGEL, B. M.; MOAYYEDI, P. Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation: systematic review and metaanalysis. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 109, n. 10, p. 1547-1561, 2014.

FRANK, D. N.; AMAND, A. L.; FELDMAN, R. A.; BOEDEKER, N. H.; HARPAZ, N.; PACE, N. R. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 34, p. 13780-13785, 2007.

FRANZ, C. M.; HUCH, M.; ABRIOUEL, H.; HOLZAPFEL, W.; GÁLVEZ, A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 2, 2011.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

GAGNON, M.; KHEADR, E.; DABOUR, N. et al. Effect of *Bifidobacterium thermacidophilum* probiotic feeding on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in BALB/c mice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 26-33, 2006.

GERRITSEN, J. SMIDT, H.; RIJKERS, G. T.; DE VOS, W. M. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. **Genes & Nutrition**, v. 6, p. 209-240, 2011.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GIBSON, G. R., HUTKINS, R., SANDERS, M. E., PRESCOTT, S. L., REIMER, R. A., SALMINEN, S. J., SCOTT, K., STANTON, C., SWANSON, K. S., CANI, P. D., VERBEKE, K., REID, G. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491-502, 2017.

GILL, H., RUTHERFURD, K., CROSS, M. Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. **Journal of Clinical Immunology**, v. 21, n. 4, p. 264-271, 2001.

GILL, H.; RUTHERFURD, K.; CROSS, M.; GOPAL, P. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 6, p. 833-839, 2001.

GIOIA, D.; ALOISIO, I.; MAZZOLA, G.; BIAVATI, B. Bifidobacteria: their impact on gut microbiota composition and their applications as probiotics in infants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 563–577, 2014.

GOPAL, P., PRASAD J., SMART, J. GILL, H. *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 207-216, 2001.

GOPAL, P., PRASAD, J., GILL, H. Effects of the consumption of *Bifidobacterium lactis* HN019 (DR10TM) and galactooligosaccharides on the microflora of the gastrointestinal tract in human subjects. **Nutrition Research**, v. 23, p. 1313-1328, 2003.

GOUGH, E.; SHAIKH, H.; MANGES, A. R. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, p. 994–1002, 2011.

GOWDA, N.; RAFTERY, D. Can NMR solve some significant challenges in metabolomics? **Perspectives in Magnetic Resonance**, v. 260, p. 144-160, 2015.

GUGLIELMETTI, S.; MORA, D.; GSCHWENDER, M. et al. *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 significantly alleviates irritable bowel syndrome and improves quality of life—a double-blind, placebo-controlled study. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 34, n. 1, p. 101-2, 2011.

GUINANE, C. M.; COTTER, P. D. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v.6, n.4, p.295-308, 2013.

HE, F.; MORITA, H.; OUWEHAND, A.C. et al. Stimulation of the secretion of pro-inflammatory cytokines by *Bifidobacterium* strains. **Microbiology and Immunology**. v. 46, n. 11, p. 781–785, 2002.

HE, T.; PRIEBE, M.G.; ZHONG, Y. et al. Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. **Journal of Applied Microbiology**. v. 104, p. 595–604, 2007.

HENRIQUE-BANA, F. C.; MACEDO JR., F.; OLIVEIRA, L. G. S.; TAKIHARA, A. M.; MIGLIORANZA, L. H. S.; SPINOSA, W. A.; COSTA, G. N. *Bifidobacterium lactis* HN019: Survival, acid production and impact on sensory acceptance of fermented milk. Aceito para publicação. **International Food Research Journal**, v. 26, n. 2 (ANEXO I).

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P; C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506-514, 2014.

HO, J. E.; LARSON, M. G. M.; GHORBANI, A.; CHENG, S.; CHEN, M. H.; KEYES, M. et al. Metabolomic profiles of body mass index in the Framingham Heart Study reveal distinct cardiometabolic phenotypes. **PLoS One**, v. 11, e0148361, 2016.

HOULT, D. I.; BUSBY, S. J.; GADIAN, D. J. et al. Observation of tissue metabolites using <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance. **Nature**, v. 252, p. 285–287, 1974.

HONG, Y. S.; AHN, Y. T.; PARK, J. C. et al. <sup>1</sup>H NMR-based metabonomic assessment of probiotic effects in a colitis mouse model. **Archives of Pharmacal Research**; v. 33, p. 1091–1101, 2010.

HONG, Y. S.; HONG, K. S.; PARK, M. H. Metabonomic understanding of probiotic effects in humans with irritable bowel syndrome. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 45, n. 5, p. 415-425, 2011.

HUTKINS, R. W.; KRUMBECK, J. A.; Bindels, L. B. et al. Prebiotics: why definitions matter. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 1-7, 2016.

ISMAIL, N. A.; RAGAB, S. H.; ELBAKY, A. et al. Frequency of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. **Archives of Medical Science**, n. 7, v. 3, p. 501-507, 2011.

ISHIZUKA, A.; TOMIZUKA, K. I.; AOKI, R. et al. Effects of administration of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* GCL2505 on defecation frequency and bifidobacterial microbiota composition in humans. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 5, p. 587–591, 2012.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Probiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 2, p. 299-313, 2004.

JANKOVIC, I.; SYBESMA, W.; PHOTHIRATH, P.; ANANTA, E.; MERCENIER, A. Application of probiotics in food products - challenges and new approaches. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 175–181, 2010.

JANDHYALA, S. M.; TALUKDAR, R.; SUBRAMANYAM, C. et al. Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 29, p. 8787-8803, 2015.

JIANG, T.; MUSTAPHA, A.; SAVAIANO, D. A. Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 5, p. 750–757, 1996.

JIANG, T.; SAVAIANO, D. A. Modification of colonic fermentation by bifidobacteria and pH in vitro (impact on lactose metabolism, short-chain fatty acid, and lactate production). **Digestive Diseases and Sciences**, v. 42, p. 2370–2377, 1997.

JONES, M. L.; MARTONI, C. J.; PARENT, M.; PRAKASH, S. Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults. **British Journal of Nutrition**, v. 107, p. 1505-13, 2012.

JUMPERTZ, R.; LE, D. S.; TURNBAUGH, P. J. et al Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, calorie load, and nutrient absorption in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, p. 58–65, 2011.

JUNG, C. H.; KIM, M. S. Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 2, p. 201-207, 2013.

JUNG, S.; LEE, K.; KANG, J. et al. Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on overweight and obese adults: a randomized, double-blind clinical trial. **Korean Journal of Family Medicine**, v. 34, p. 80-89, 2013.

JUNGERSEN, M.; WIND, A.; JOHANSEN, E.; CHRISTENSEN, J. E.; STUERLAURIDSEN, B.; ESKESEN, D. The science behind the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12. **Microorganisms**, v. 2, n. 2, p. 92–110, 2014.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulinresistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840-6, 2006.

KARALIS, K. P.; GIANNOGONAS, P.; KODELA, E. et al. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. **FEBS Journal**, v. 276, p. 5747–54, 2009.

KASATPIBAL, N.; WHITNEY, J. D.; SAOKAEW, S.; KENGKLA, K.; HEITKEMPER, M. M.; APISARNTHANARAK, A. Effectiveness of probiotic, prebiotic, and synbiotic therapies in reducing postoperative complications: a systematic review and network meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, n. 62, p. 153-160, 2017.

KATO, K.; MIZUNO, S.; UMESAKI, Y. et al. Randomized placebo controlled trial assessing the effect of bifidobacteria fermented milk on active ulcerative colitis. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 20, n. 10, p. 1133–1141, 2004.

KIESSLING, G.; SCHNEIDER, J.; JAHREIS, G. Long-term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, n. 9, p. 843–849, 2002.

KIM, M.; KIM, M.; KANG, M. et al. Effects of weight loss using supplementation with *Lactobacillus* strains on body fat and medium-chain acylcarnitines in overweight individuals. **Food & Function**; v. 8, p. 250–261, 2017.

KOENIG, J. E.; SPOR, A.; SCALFONE, N.; FRICKER, A. D.; STOMBAUGH, J.; KNIGHT, R.; ANGENENT, L. T.; LEY, R. E. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 4578-4585, 2011.

KOH, A.; DE VADDER, F.; KOVATCHEVA-DATCHARY, P.; BACKHED, F. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. **Cell**, v. 165, p. 1332–1345, 2016.

KOLIDA, S.; GIBSON, G. R. Synbiotics in health and disease. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, p. 373-393, 2011.

KOPPEL, N.; BALSUS, E. P. Exploring and understanding the biochemical diversity of the human microbiota. **Cell Chemical Biology**, v. 23, n. 1, p. 18-30, 2016.

KOREN, O.; GOODRICH, J. K.; CULLENDER, T. C. et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. **Cell**, v. 150, p. 470-480, 2012.

KRUMBECK, J. A.; WALTER, J.; HUTKINS, R. W. Synbiotics for improved human health: recent developments, challenges, and opportunities. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 9, p. 451-479, 2018.

KULINICH, A.; LIU, L. Human milk oligosaccharides: the role in the fine-tuning of innate immune responses. **Carbohydrate Research**, v. 432, p. 62–70, 2016.

KUN, S.; REZESSY-SZABÓ, J. M.; NGUYEN, Q. D. et al. Changes of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected *Bifidobacterium* strains. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 8, p. 816–821, 2008.

LAITINEN, K. POUSSA T, ISOLAURI E. Nutrition, Allergy, Mucosal Immunology and Intestinal Microbiota Group. Probiotics and dietary counselling contribute to glucose regulation during and after pregnancy: a randomized controlled trial. **British Journal of Nutrition**, v. 101, p. 1679-87, 2009.

- LAMPE, J. W.; NAVARRO, S. L.; HULLAR, M. A.; SHOJAIE, A. Inter-individual differences in response to dietary intervention: integrating omics platforms toward personalised dietary recommendations. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 72, n. 2, p. 207-218, 2013.
- LEAHY, S. C.; HIGGINS, D. G.; FITZGERALD, G. F.; VAN SINDEREN, D. Getting better with bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1303-1315, 2005.
- LEIVERS, S.; HIDALGO-CANTABRANA, C.; ROBINSON, G. et al. Structure of the high molecular weight exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA-R1 and sequence analysis of its putative EPS cluster. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 17, p. 2710–2717, 2011.
- LEY, R. E.; BÄCKHED, F.; TURNBAUGH, P.; LOZUPONE, C. A.; KNIGHT, R. D.; GORDON, J. I. Obesity alters gut microbial ecology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 31, p. 11070-5, 2005.
- LEY, R. E.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**, v. 124, p. 837-848, 2006.
- LEY, R. E.; TURNBAUGH, P. J.; KLEIN, S.; GORDON, J. I. Microbial Ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature - Brief Communications**. v. 444, p. 1022-1023, 2006.
- LIM, L. H.; LI, H. Y.; HUANG, C. H. et al. The effects of heat-killed wild-type *Lactobacillus casei* Shirota on allergic immune responses in an allergy mouse model. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 148, n. 4, p. 297-304, 2009.
- LINDON, J. C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. Peer Reviewed: So What's the Deal with Metabonomics? **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 17, p. 384-391, 2003.
- LINDON, J.C.; NICHOLSON, J.K. Spectroscopic and statistical techniques for information recovery in metabonomics and metabolomics. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 1, p. 45-69, 2008.
- LIU, C., ZHANG, Z., DONG, K., GUO, X. Adhesion and immunomodulatory effects of *Bifidobacterium lactis* HN019 on intestinal epithelial cells INT-407. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 18, p. 2283-2290, 2010.
- LUNDBERG, P. et al. MDL - **The Magnetic Resonance Metabolomics Database** (mdl.imv.liu.se), ESMRMB, Basel, Suíça, 2005. Disponível em: <<http://www.liu.se/hu/mdl/main/>>. Acesso em: 12 fev. 2016.
- LUOTO, R.; KALLIOMÄKI, M.; LAITINEN, K. et al. The impact of perinatal probiotic intervention on the development of overweight and obesity: follow-up study from birth to 10 years. **International Journal of Obesity**, v. 34, p. 1531-7, 2010.
- MARCHESI, J. R.; ADAMS, D. H.; FAVA, F.; HERMES, G. D.; HIRSCHFIELD, G. M.; HOLD, G. et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. **Gut**, v. 65, n. 2, p. 330-339, 2016.

MARIAT, D.; FIRMESSE, O.; LEVENZES, F.; GUIMARÃES, V. D.; SOKOL, H.; DORÉ, J.; CORTHER, G.; FURET, J. P. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. **BioMed Central Microbiology**, v. 9, n. 23, p. 1-6, 2009.

MARKET RESEARCH REPORT. **Probiotic Market By Application**(Food & Beverages, Dietary Supplements, Animal Feed), By End-use, By Region, And Segment Forecast, 2018 - 2024. Disponível em:<<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/probiotics-market>>. Acesso em 10 maio 2018.

MARKLEY, J. L.; BRÜSCHWEILER, R.; EDISON, A. S. et al. The future of NMR-based metabolomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 43, p. 34-40, 2017.

MARTÍNEZ, I.; MULLER, C. E.; WALTER, J. Long-term temporal analysis of the human fecal microbiota revealed a stable core of dominant bacterial species. **Plos One**, v. 8, i. 7, e69621, 2013.

MASCO, L.; VENTURA, M.; ZINK, R.; HUYS, G.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1137–1143, 2004.

McCABE, L., BRITTON, R. A. & PARAMESWARAN, N. Prebiotic and probiotic regulation of bone health: role of the intestine and its microbiome. **Current Osteoporosis Reports**, v. 13, p. 363–371, 2015.

McNULTY, N. P.; YATSUNENKO, T.; HSIAO, A.; FAITH, J. J.; MUEGGE, B. D.; GOODMAN, A. L.; HENRISSAT, B.; OOZEER, R.; COOLS-PORTIER, S.; GOBERT, G.; CHERVAUX, C., KNIGHTS, D.; LOZUPONE, C. A.; KNIGHT, R.; DUNCAN, A. E.; BAIN, J. R.; MUEHLBAUER, M. J.; NEWGARD, C. B.; HEATH, A. C.; GORDON, J. I. The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. **Science Translation Medicine**, v. 106, n. 3, 2011.

MEILE, L.; LUDWIG, W.; RUEGER, U.; GUT, C.; KAUFMANN, P.; DASEN, G.; WENGER, S.; TEUBER, M. *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, p. 57-64, 1997.

MENG, H.; LEE, Y.; BA, Z.; PENG, J.; LIN, J.; BOYER, A.; FLEMING, J. A.; FURUMOTO, E. J.; ROBERTS, R. F.; KRIS-ETHERTON, P. M.; ROGERS, J. Consumption of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 impacts upper respiratory tract infection and the function of NK and T cells in healthy adults. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 60, n. 5, p. 1161–1171, 2016.

MENNI, C.; MIGAUD, M.; KASTENMÜLLER, G.; PALLISTER, T.; ZIERER, J.; PETERS, A. et al. Metabolomic profiling of long-term weight change: role of oxidative stress and urate levels in weight gain. **Obesity**, v. 25, p. 1618–1624, 2017.

- MICCHELI, A.; CAPUANI, G.; MARINI, F. et al.: Urinary  $^1\text{H}$ -NMR-based metabolic profiling of children with NAFLD undergoing VSL#3 treatment. **International Journal of Obesity**, v. 39, p. 1118–1125, 2015.
- MIGLIORANZA SCAVUZZI, B.; MIGLIORANZA, L. H.; HENRIQUE, F. C. et al. The role of probiotics on each component of the metabolic syndrome. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 19, n. 8, p. 1127-1138, 2015.
- MILANI, C.; DURANTI, S.; LUGLI, G. A.; BOTTACINI, F.; STRATI, F.; ARIOLI, S.; FORONI, E.; TURRONI, F.; VAN SINDEREN, D.; VENTURA, M. Comparative genomics of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* reveals a strict monophyletic bifidobacterial taxon. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 14, p. 4304-4315, 2013.
- MOHAN, R.; KOEBNICK, C.; SCHILDT, J. et al. Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 4025–4031, 2006.
- MOHAN, R.; KOEBNICK, C.; SCHILDT, J. et al. Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on body weight, fecal pH, acetate, lactate, calprotectin, and IgA in preterm infants. **Pediatric Research**, v. 64, n. 4, p. 418–422, 2008.
- MOREIRA, A. P.; TEXEIRA, T. F.; FERREIRA, A. B. et al. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. **British Journal Nutrition**, v. 108, n. 5, p. 801-9, 2012.
- MUGAMBI, M. N.; MUSEKIWA, A.; LOMBARD, M.; YOUNG, T.; BLAAUW, R. Association between funding source, methodological quality and research outcomes in randomized controlled trials of synbiotics, probiotics and prebiotics added to infant formula: a systematic review. **BMC Medical Research Methodology**, v. 13, n. 137, 2013.
- MURPHY, E. F.; COTTER, P. D.; HEALY, S. et al. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. **Gut**, v. 12, p. 1635-42, 2010.
- NARUSZEWICZ, M.; JOHANSSON, M. L.; ZAPOLSKA-DOWNAR, D.; BUKOWSKA, H. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 1249-1255, 2002.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH - NIH. National Heart, Lung and Blood Institute. National Cholesterol Education Program. *Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III)*. NHI, 2002.
- NDAGIJIMANA, M. et al. Effect of a synbiotic food consumption on human gut metabolic profiles evaluated by  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v.134, n.1, p. 147-153, 2009.
- NEEF, A.; SANZ, Y. Future for probiotic science in functional food and dietary supplement development. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 16, p. 679-687, 2013.

NEELAND, I. J.; POIRIER, P.; DESPRE'S, J. P. Cardiovascular and metabolic heterogeneity of obesity: clinical challenges and implications for management. **Circulation**, v. 137, p. 1391–1406, 2018.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems**, v. 29, n. 11, p. 1181–1189, 1999.

NG, M. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, v. 384, n. 9945, p. 766-781, 2014.

OLIVER, S.G.; WINSON, M.K.; KELL, D.B.; BAGANZ, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 373-378, 1998.

O'KEEFE, S. J. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 3, n. 12, p. 691–706, 2016.

O'SULLIVAN, O.; COAKLEY, M., LAKSHMINARAYANAN, B. et al. Alterations in intestinal microbiota of elderly Irish subjects post-antibiotic therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 214-221, 2013.

PALMER, C.; BIK, E. M.; DIGIULIO, D. B.; RELMAN, D. A.; BROWN, P. O. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. **Plos Biology**, v. 5, n. 7, p. 1556-1573, 2007.

PANDEY, K. R.; NAIK, S. R.; VAKIL, B. V. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. **The Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 7577–7587, 2015.

PATEL, R. M.; LIN, P. W. Developmental biology of gut-probiotic interaction. **Gut Microbes**, v.1, n. 3, p. 186-195, 2010.

PEDERSEN, S. M.; NEBEL, C.; NIELSEN, C. N. et al. A GC–MS-based metabonomic investigation of blood serum from irritable bowel syndrome patients undergoing intervention with acidified milk products. **European Food Research and Technology**, v. 233, p. 1013-1021, 2011.

PIENING, B. D.; ZHOU, W.; CONTREPOIS, K.; ROST, H.; GU URBAN, G. J.; MISHRA, T. et al. Integrative personal omics profiles during periods of weight gain and loss. **Cell Systems**, v. 6, p. 157–170, 2018.

PRASAD, J.; GILL, H.; SMART, J.; GOPAL, P. Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 993-1002, 1998.

PRASANNA, P. H.; GRANDISON, A. S; CHARALAMPOPOULOS, D. Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. **Food Research International**, v. 55, p. 247-262, 2014.

PUNIYA, A. K. **Fermented milk and dairy products**. Boca Raton: CRC Press, 2015.

PURCELL, E.; TORREY, H.; POUND, R. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. **Physical Review**, v, 69, p. 37-38, 1946.

QIAO, H.; DUFFY, L.C.; GRIFFITHS, E. et al. Immune responses in rhesus rotavirus-challenged BALB/c mice treated with bifidobacteria and prebiotic supplements. **Pediatric Research**, v. 51, p. 750–755, 2002.

QIN, J.; LI, R.; RAE, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, n. 4, p. 59-67, 2010.

RAEISI, S. N.; OUOBA, L. I.; FARAHMAND, N. A. et al. Variation, viability and validity of bifidobacteria in fermented milk products. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 691-697, 2013.

RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M.; DE VOS, W. M. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 5, p. 996–1047, 2014.

RAJOKA, M. R.; SHI, J.; MEHWISH, H. M.; ZHU, J.; LI, Q.; SHAO, D.; HUANG, Q.; YANG, H. Interaction between diet composition and gut microbiota and its impact on gastrointestinal tract health. **Food Science and Human Wellness**, v. 6, n. 3, p. 121-130, 2017.

RASTALL, R. A.; GIBSON, G. R. Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, p. 42-46, 2015.

RETTGER, L. F.; CHEPLIN, H. A. A. Treatise on the transformation of the intestinal flora: with special reference to the implantation of *Bacillus acidophilus*. London: **Yale University Library**, v. 13, 1921. Disponível em: <[https://archive.org/stream/treatiseontransf00rettuoft/treatiseontransf00rettuoft\\_djvu.txt](https://archive.org/stream/treatiseontransf00rettuoft/treatiseontransf00rettuoft_djvu.txt)>. Acesso em 09 de maio 2018.

RICHARDS, J. L.; YAP, Y. A.; MCLEOD, K. H. et al. Dietary metabolites and the gut microbiota: an alternative approach to control inflammatory and autoimmune diseases. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, n.5, e82, 2016.

RIDAURA, V. K.; FAITH, J. J.; REY, F. E.; CHENG, J.; DUNCAN, A. E.; KAU, A. L. et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. **Science**, v. 341, n. 6150, 2013.

ROBERTSON, D. G. Metabonomics in toxicology: a review. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 85, n. 2, p. 809–22, 2005.

RUSSELL, D. A.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 88-105, 2011.

SACCENTI, E.; HOEFSLOOT, H. C.; SMILDE, A. K. et al. Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. **Metabolomics**, v. 10, n. 3, p. 361–374, 2014.

SADRZADEH-YEGANEH, H.; ELMADFA, I.; DJAZAYERY, A. et al. The effects of probiotic and conventional yoghurt on lipid profile in women. **British Journal of Nutrition**, v. 103, p. 1778-83, 2010.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; BENNO, Y.; LEE, Y. K. Probiotics: how should they be defined? **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 107–110, 1999.

SANCHEZ, M.; DARIMONT, C.; DRAPEAU, V. et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC1.3724 supplementation on weight loss and maintenance in obese men and women. **British Journal of Nutrition**, v. 111, p. 1507-19, 2014.

SANDERS, M. Summary of probiotic activities of *Bifidobacterium lactis* HN019. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 40, n. 9, p. 776-83, 2006.

SANZ, Y.; SANTACRUZ, A.; GAUFFIN, P. Gut microbiota in obesity and metabolic disorders. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, p. 434–41, 2010.

SANZ, Y.; RASTMANESH, R.; AGOSTONIC, C. Understanding the role of gut microbes and probiotics in obesity: How far are we? **Pharmacological Research**, v. 69, p. 144-155, 2013.

SARBINI, S.; RASTALL, R. A. Prebiotics: metabolism, structure, and function. **Functional Food Reviews**, v. 3, p. 93–106, 2011.

SAVAGE, D. C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annual Review of Microbiology**, v. 31, p. 107–133, 1977.

SAWADA, D.; SUGAWARA, T.; ISHIDA, Y. et al. Effect of continuous ingestion of a beverage prepared with *Lactobacillus gasseri* CP2305 inactivated by heat treatment on the regulation of intestinal function. **Food Research International**, v. 79, p. 33-39, 2016.

SAZAWAL, S., DHINGRA, U., SARKAR, A., DHINGRA, P., DEB, S., MARWAH, D., MENON, V., KUMAR, J., BLACK, R. Efficacy of milk fortified with a probiotic *Bifidobacterium lactis* (DR-10TM) and prebiotic galactooligosaccharides in prevention of morbidity and on nutritional status. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 13:S28, 2004.

SCANO, P.; CUSANO, E.; CABONI, P.; CONSONNI, R. NMR metabolite profiles of dairy: A review. **International Dairy Journal**, v. 90, p. 56-67, 2019.

SCARDOVI, V.; TROVATELLI, D.; ZANI, G.; CROCIANI, F.; MATTEUZZI, D. Deoxyribonucleic acid homology relationships among species of the genus *Bifidobacterium*. **Journal of Systematic Bacteriology**, v. 21, p. 276-294, 1971.

SCHNORR, S. L.; CANDELA, M.; RAMPPELLI, S.; CENTANNI, M.; CONSOLANDI, C.; BASAGLIA, G.; TURRONI, S.; BIAGI, E.; PEANO, C.; SEVERGNINI, M.; FIORI, J.; GOTTI, R.; DE BELLIS, G.; LUISELLI, D.; BRIGIDI, P.; MABULLA, A.; MARLOWE, F.; HENRY, A. G.; CRITTENDEN, A. N. Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. **Nature Communications**, v. 5, n. 3654, 2014.

SCHWIERTZ, A.; TARAS, D.; SCHÄFER, K.; BEIJER, S.; BOS, N. A.; DONUS, C.; HARDT, P. D. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. **Obesity**, v. 18, n. 1, p. 190-195, 2010.

SEELEY, P.J.; BUSBY, S.J.W.; GADIAN, D.G.; RADDA, G.R.; RICHARDS, R.E. A new approach to metabolite compartmentation in muscle biochemical. **Biochemical Society Transactions**, v. 4, n. 1, p. 62-64, 1976.

SEKIROV, I.; RUSSELL, S. L.; ANTUNES, C. M.; FINLAY, B. B. Gut microbiota in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 90, p. 859-904, 2010.

SEMOVA, I.; CARTEN, J. D.; STOMBAUGH, J. et al. Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish. **Cell Host & Microbe**, v. 12, p. 277-88, 2012.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. **PLOS Biology**, v. 14, n. 8, e1002533, 2016.

SHERWIN, E.; REA, K.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. A gut (microbiome) feeling about the brain. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 32, p. 96-102, 2016.

SHI, X.; WEI, X.; YIN, X. et al. Hepatic and fecal metabolomic analysis of the effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on alcoholic fatty liver disease in mice. **Journal of Proteome Research**, v. 14, p. 1174-1182, 2015.

SHIRASAWA, Y.; SHIBAHARA-SONE, H.; IINO T. et al. *Bifidobacterium bifidum* BF-1 suppresses *Helicobacter pylori*-induced genes in human epithelial cells. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 10, p. 4526-34, 2010.

SHU, Q.; HAI, L.; RUTHERFURD, K. J.; FENWICK, S. G.; PRASAD, J.; GOPAL, P. K.; GILL, H. S. Dietary *Bifidobacterium lactis* (HN019) enhances resistance to oral *Salmonella typhimurium* infection in mice. **Microbiology and Immunology**, v. 44, p. 213-222, 2000.

SHU, Q.; GILL, H.S. A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HN019) reduces the severity of *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 189, p. 147-152, 2001.

SHU, Q.; QU, F.; GILL, H. Probiotic treatment using *Bifidobacterium lactis* HN019 reduces weanling diarrhea associated with rotavirus and *Escherichia coli* infection in a piglet model. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 33, p. 171-177, 2001.

SINGH, J.; RIVENSON, A.; TOMITA, M. et al. *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 4, p.833-41, 1997.

SIMRÉN, M.; BARBARA, G.; FLINT, H. J.; SPIEGEL, B. R.; SPILLER, R. C.; VANNER, S.; VERDU, E. F.; WHORWELL, P. J.; ZOETENDAL, E. G. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. **Gut**, v. 62, p. 159-176, 2013.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. S.; SPIER, M. R.; MEDEIROS, A. P.; YAMAGUISHI, C. T.; LINDNER, J. D.; PANDEY, A.; THOMAZ-SOCCOL, V. The potential of probiotics: a review. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 4, p. 413-434, 2010.

SONNENBURG, E.D.; SMITS, S.A.; TIKHONOV, M.; HIGGINBOTTOM, S.K.; WINGREEN, N.S.; SONNENBURG, J. L. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. **Nature**, v. 529, p. 212–215, 2016.

STENMAN, L. K.; HOLMA, R.; KORPELA, R. High-fat-induced intestinal permeability dysfunction associated with altered fecal bile acids. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, p. 923-9, 2012.

TAVERNITI, V.; GUGLIELMETTI, S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). **Genes Nutrition**, v. 6, p. 261-274, 2011.

THE HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, p. 207-214, 2012.

TIIHONEN, K.; OUWEHAND, A. C.; RAUTONEN, N. Human intestinal microbiota and health ageing. **Ageing Research Reviews**, v. 9, n. 1, p. 107-116, 2010.

TISSIER, H. **Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (Etat normal et pathologique)**. 1900. Tese de doutorado. Universidade de Paris, Paris, França, 1900.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. Probiotics Market - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, and Forecast 2018-2026. Acesso em: 25 fev. 2019. <<https://www.transparencymarketresearch.com/pressrelease/probiotics-market.htm>>.

TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; MAHOWALD, M. A. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, n. 21/28, p. 1027-1031, 2006.

TURNBAUGH, P. J.; BÄCKHED, F.; FULTON, L.; GORDON, J. I. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. **Cell Host Microbe**, v. 3, n. 4, p. 213-223, 2008.

TURNBAUGH, P. J.; HAMADY, M.; YATSUNENKO, T. et al. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 480–484, 2009.

TURRONI, F.; VAN SINDEREN, D.; VENTURA, M. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 37-44, 2011.

URSELL, L. K. et al. The intestinal metabolome: an intersection between microbiota and host. **Gastroenterology**, v.146, n.6, p.1470-1476,2014.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 714-728, 2008.

VAZQUEZ-FRESNO, R.; LLORACH, R.; MARINIC, J. et al. Urinary metabolomic fingerprinting after consumption of a probiotic strain in women with mastitis. **Pharmacological Research**, v. 87, p. 160–165, 2014.

VENTURA, M.; TURRONI, F.; LUGLI, G. A. et al. Bifidobacteria and humans: our special friends, from ecological to genomics perspectives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 163-168, 2014.

VERNOCCHI, P.; VANNINI, L.; GOTTARDI, D. et al. Integration of datasets from different analytical techniques to assess the impact of nutrition on human metabolome. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.2, n.1, p.1-10, 2012.

VRIEZE, A.; VAN NOOD, E.; HOLLEMAN, F. et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. **Gastroenterology**, v. 143, p. 913-916, 2012.

VULEVIC, J.; JURIC, A.; WALTON, G. E.; CLAUS, S. P.; TZORTZIS, G.; TOWARD, R. E.; GIBSON, G. R. Influence of galacto-oligosaccharide mixture (BGOS) on gut microbiota, immune parameters and metabolomics in elderly persons. **British Journal of Nutrition**, v. 114, p. 586–595, 2015.

WALLER, P.; GOPAL, P.; LEYER, G.; OUWEHAND, A. C.; REIFER, C.; STEWART, M. E.; MILLER, L.E. Dose-response effect of *Bifidobacterium lactis* HN019 on whole gut transit time and functional gastrointestinal symptoms in adults. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 49, n. 9, p. 1057-1064, 2011.

WANG, C.; SHOJI, H.; SATO H. et al. Effects of oral administration of *Bifidobacterium breve* on fecal lactic acid and short-chain fatty acids in low birth weight infants. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 44, n. 2, p. 252-257, 2007.

WANG, Z.; KLIPFELL, E.; BENNETT, B. J. et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. **Nature**, v. 472, n. 7341, p. 57-63, 2011.

WANG, M.; ZHANG, X.; WANG, Y.; LI, Y.; CHEN, Y.; ZHENG, H. et al. Metabonomic strategy for the detection of metabolic effects of probiotics combined with prebiotic supplementation in weaned rats. **RSC Advances**, v. 5042, 2018.

WASSENAAR, T. M. Insights from 100 Years of Research with Probiotic *E. Coli*. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 6, n. 3, p. 147-161, 2016.

WILLING, B. P.; DICKSVED, J.; HALFVARSON, J.; ANDERSSON, A. F.; LUCIO, M.; ZHENG, Z.; JARNEROT, G.; TYSK, C.; JANSSON, J. K.; ENGSTRAND, L. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. **Gastroenterology**, v. 139, p. 1844-1854, 2010.

WISHART, D. S.; FEUNANG, Y. D.; MARCU, A.; GUO, A. C.; LIANG, K.; VÁZQUEZ-FRESNO, R. et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. **Nucleic Acids Research**, v.46, n.D608-D617, 2018. Disponível em: <<http://www.hmdb.ca/>>. Acesso em 23jan. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Obesity and overweigh**. Media Centre, Fact sheet N°311, Atualizado em Fevereiro de 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 17 abr. 2018.  
WU, G. D.; CHEN, J.; HOFFMANN, C. et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. **Science**, v. 334, n. 6052, p. 105-108, 2011.

XIAO, J. Z.; KONDO, S.; TAKAHASHI, N. et al. Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. **Journal of Dairy Science**, v. 61, p. 2452-61, 2003.

XU, Z.; KNIGHT, R. Dietary effects on human gut microbiome diversity. **British Journal of Nutrition**, v. 113, S1-5, 2015.

YATSUNENKO, T.; REY, F. E.; MANARY, M. J. et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, v. 486, p. 222-228, 2012.

ZENG, J.; JIANG, J.; ZHU, W.; CHU, Y. Heat-killed yogurt-containing lactic acid bacteria prevent cytokine-induced barrier disruption in human intestinal Caco-2 cells. **Annals of Microbiology**, v. 66, n.1, p. 171-8, 2016.

ZHANG, L.L.; CHEN, X.; ZHENG, P.Y. et al. Oral *Bifidobacterium* modulates intestinal immune inflammation in mice with food allergy. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 25, p. 928-934, 2010.

## **CAPÍTULO 2 - *Bifidobacterium lactis* HN019: SURVIVAL, ACID PRODUCTION AND IMPACT ON SENSORY ACCEPTANCE OF FERMENTED MILK**

<sup>1\*</sup>Henrique-Bana, F. C.; <sup>2</sup>Macedo Jr, F.; <sup>3</sup>Oliveira, L. G. S.; <sup>1</sup>Takahara, A. M.; <sup>1</sup>Miglioranza, L. H. S.; <sup>1</sup>Spinosa, W. A.; <sup>3</sup>Costa, G. N.

### **Affiliations:**

<sup>1</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 86057-970, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 86057-970, Brazil.

<sup>3</sup>Mestrado Acadêmico em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Universidade Norte do Paraná, Londrina, PR, 86041-100, Brazil.

**\*Corresponding author:** Fernanda C. Henrique-Bana

E-mail address: ferchenrique@gmail.com

Published in **International Food Research Journal** (ANEXO I).

### **ABSTRACT**

*Bifidobacterium lactis* HN019 was monitored for its viability and acid production during milk fermentation and cold storage. Milk was fermented for 72 h at 37°C, and the shelf life of the resulting probiotic milk was evaluated at 4°C for 30 days. Additionally, lactic and acetic acid and lactose content during fermentation were measured by *in situ* quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (isq <sup>1</sup>H NMR), and the sensorial acceptance of the fermented milk was evaluated by 80 panelists. The pH of the milk fermented by *B. lactis* HN019 reduced from 6.36 to 3.97 after 72 h of incubation. Viability of the evaluated strain was maintained

above 9.21 up to a decrease to 8.85 log colony-forming units (CFU)/mL after 48 h of fermentation. With respect to metabolism, isq  $^1\text{H}$  NMR revealed that the acetic and lactic acid content increased from  $0.47 \pm 0.06$  g/L to  $16.36 \pm 1.86$  g/L and  $2.59 \pm 0.10$  g/L to  $9.40 \pm 0.18$  g/L, respectively, indicating high production of acetic acid by HN019 during 72 h of fermentation. On the other hand, lactose content decreased throughout the fermentation period. In fact, strain HN019 showed a high content of acetate throughout fermentation; however, exhibited the stability required in fermented milks with high viable cell counts and low activity of post-acidification during the shelf life. In sensory evaluation, the panelists preferred the probiotic milk fermented for eight h because after 72 h the acetic flavor was already perceptible.

**Keywords:** probiotics, organic acids, quantitative  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy, fermented dairy products.

## 2.1 INTRODUCTION

Fermented milks containing probiotics have been extensively explored commercially. Of these dairy products, products obtained using Bifido strains are an important category worldwide. In fact, *Bifidobacterium* is one of the most important groups of probiotic cultures used in fermented milk production owing to their well-documented health-promoting properties in the human host (Urita *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2016). However, production of fermented milk using bifidobacteria is a great challenge in the dairy industry because milk is not a suitable matrix for the growth of this genus as they lack essential proteolytic activity (Prasanna *et al.*, 2014). Thus, a longer fermentation time may be necessary, resulting in some defects, such as sandy or slimy texture, yeasty or vinegary taste, or insufficient aroma (Sreeja and Prajapati, 2015).

*Bifidobacterium* is not included in the traditional lactic acid bacteria (LAB) group owing to its genetic and physiological unrelatedness. However, for practical and traditional reasons, it

is considered as belonging to the LAB order (Russel *et al.*, 2011). Moreover, bifidobacteria differ from other colonic genera with respect to the mechanism employed to ferment carbohydrates (Mayo *et al.*, 2010). Bifidobacteria metabolize hexoses using the “bifidus pathway”, whose key enzyme is fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK), which leads to a theoretical molar ratio of acetate to lactate of 3:2 (Scardovi *et al.*, 1971). Furthermore, it has been suggested that the proportion of the final fermentation products varies considerably from one strain to another and is dependent on the carbon source used and the growth phase (Oliveira *et al.*, 2009).

*Bifidobacterium lactis* HN019 is a commercial probiotic strain with beneficial effects such as prevention against infections (Shu and Gill, 2001; Gopal *et al.*, 2001); positive changes in the intestinal microbiota (Ahmed *et al.*, 2007); decrease in whole gut transit, gut discomfort conditions in adults (Waller *et al.*, 2011); decrease in obesity, blood lipids, and inflammatory markers in patients with metabolic syndromes (Bernini *et al.*, 2016); and immunity enhancement, as reported by multiple studies (Sanders, 2006; Bogsan *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2017).

Additionally, HN019 strain exhibits interesting characteristics, such as oxygen, bile, and acid tolerance, rendering this microorganism adequate for industrial utilization in fermented milks (Sanders, 2006). Therefore, this strain is sold as a probiotic culture and is commonly used in association with starter cultures in the formulation of dairy products.

Monitoring the organic acid content in milk fermented using different *Bifidobacterium* strains is important for dairy technology, either as an indicator of fermentation or as a means to evaluate strain efficiency (Bouteille *et al.*, 2013). Thus, *in situ* quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (isq  $^1\text{H}$  NMR) has been tested to evaluate bacterial metabolites in dairy gels (Bouteille *et al.*, 2013). Moreover, NMR is a nondestructive method

and a qualitative and quantitative tool that does not require separation or chemical modification (Gowda and Raftery, 2015).

Although a high level of documentation about *B. lactis* HN019 identity, safety and health effects on the host (Meile *et al.*, 1997, Masco *et al.*, 2004; Zhou and Gill, 2005; Dekker *et al.*, 2009), there is limited published information concerning its metabolism or the technological production in dairy products. Herein, we report the efficiency of the HN019 strain, the viability and acidification during milk fermentation and cold storage, as well as, the effect of acid production on sensory acceptance. In addition, lactic and acetic acids production and lactose consumption were quantified by isq <sup>1</sup>H NMR.

## 2.2 MATERIALS AND METHODS

### 2.2.1 Sample, Microorganism and Chemicals

Skim milk powder was acquired from Confepar (Londrina, PR, Brazil) and the culture *B. lactis* HN019<sup>TM</sup> (also known as HOWARU<sup>®</sup> Bifido) was purchased from DuPont<sup>TM</sup> Danisco A/S (Copenhagen, Denmark). Analytical standard chemicals (S)-2-hydroxypropionic acid (L-(+)-lactic acid), acetic acid solution for HPLC, D-Lactose monohydrate (*4-O-β-D-galactopyranosyl-D-glucose*), TSP [3-(trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3-d<sub>4</sub> acid], and 98.0% sodium hydroxide were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

### 2.2.2 Production of Fermented Milk

Milk was prepared by adding 10% (w/v) of skim cow milk powder (Confepar, Londrina, PR, Brazil) to water and then thermally treated at 121°C for 15 min, followed by cooling to 37°C in an ice bath. The freeze-dried culture was added through Direct Vat Inoculation (DVI), with mass percentage of 0.25% w/v [11 log colony forming units (CFU)/mL] (Bernini *et al.*, 2016), and the inoculated milk was incubated at 37°C for 72 h. The viable microbial count, pH,

TA, and organic acid and lactose content were determined by NMR in the milk after 0–12 h (every 2 h), 12–24 h (every 4 h), 48 h, and 72 h of incubation. Three replicates of each fermentation were performed, and the experiments were performed in triplicate. From the bacteriological incubator, the samples were collected and then subjected to viable count measurement and chemical analysis. Additionally, three aliquots of each time point were frozen immediately at  $-18^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) in Eppendorf tubes to minimize bacterial activity.

### 2.2.3 Determination of pH and TA

The pH of the samples was measured using a pH meter (Kasvi, Curitiba, PR, Brazil). TA was determined using the potentiometric method determined by AOAC (2012).

### 2.2.4 Detection of Viable Cell Counts of Bifidobacteria

Samples of fermented milk were ten-fold serially diluted with sterile 0.1% (w/v) peptone water until proper dilution. Then, viable cell counts of the probiotic strain HN019 were determined on De Man Rogosa Sharpe (MRS) agar enriched with L-cysteine as the reducing agent as previously described (Castele *et al.*, 2006) with modifications; specifically, the concentration of L-cysteine was increased to 0.3% because no growth was observed at 0.05%. Petri dishes were incubated for 72 h at  $37^{\circ}\text{C}$  under anaerobiosis (Anaerobac of Probac<sup>®</sup>). The results were expressed as CFU/mL of fermented milk.

### 2.2.5 Effect of Cold Storage on Probiotic Survival

Based on preliminary results, fermentation was performed in a single bottle cap for 12 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . After fermentation, the product was placed in 50-mL sterile Falcon plastic tubes and stored at  $4^{\circ}\text{C}$  for 30 days. Samples were taken at seven-day intervals, and pH, TA, and viable cell counts were determined.

### 2.2.6 Sensory Analysis

The study involving humans was conducted according to the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethical Committee on Human Research of the Universidade Norte do Paraná, PR, Brazil (process number 67602217.1.0000.0108) (ANEXO II).

Sensory analysis of the probiotic fermented milk was performed after 8 h and 72 h of fermentation using individual booths with white light. Fifty milliliter of each fermented milk sample was packed in plastic white cups at  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  and identified with random three-digit codes. The untrained panelists ( $n = 80$ ) included students and members of the staff of the University Campus. The panelists were asked to evaluate both samples to identify the most acidic sample by means of the paired comparison test (forced choice test). The paired preference test was also performed to determine the preferred sample. Finally, the purchase intent test was conducted using the following five-point scale: 5, “definitely buy”; 4, “probably buy”; 3, “may or may not buy”; 2, “probably not buy”; and 1, “definitely not buy”.

### 2.2.7 Analytical Method

#### 2.2.7.1 Calibration curves for isq $^1\text{H}$ NMR

Standard solutions of acetic acid, lactic acid, and lactose were prepared in Milli-Q water from authentic and new stock solutions of the highest purity available. Five standard solutions were obtained for each metabolite with concentrations of acetic acid ranging from 0.8 to 46.86 g/L, lactic acid ranging from 0.8 to 16 g/L, and lactose ranging from 2 to 85.4 g/L. These concentration ranges were chosen in accordance with the average concentrations found in milk fermented by bifidobacteria (Østlie *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2007).

### 2.2.7.2 isq $^1\text{H}$ NMR

Immediately prior to measurements, fermented milk samples from 12 time points (between 0 and 72 h) were thawed and homogenized by thorough vortexed for approximately 1 min. Aliquots of 500  $\mu\text{L}$  of each sample were introduced into 5-mm NMR glass tubes (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Mo., USA). A sealed glass capillary tube containing a solution of 0.48% TSP in  $\text{D}_2\text{O}$  (deuterium oxide; 99.9% atom D; Sigma Aldrich) was also introduced into each NMR tube as the internal chemical shift reference. NMR experiments were performed using a 400.13 MHz Bruker spectrometer (Mod. Avance III, Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany) equipped with a 5-mm multinuclear Broaband Inverse Probe (BBI). All spectra were acquired using the same parameters: 16 scans of 32k data points, spectral width of 4 kHz, recycle delay of 25 s per scan, flip angle of  $90^\circ$ , and requiring 8 min and 19 s per sample. All spectra were also recorded at a temperature of 298 K. The resulting spectra were phased, baseline corrected, and then calibrated for TSP at 0.00 ppm using TopSpin software version 3.5.7 (Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany).

### 2.2.7.3 Quantitative analysis by integration

Lactic and acetic acid and lactose NMR signals were integrated in TopSpin version 3.5.7. Integration was performed both for the reference spectra with known concentrations of the analytes and for the milk spectra. The resulting data of standard solutions were plotted to produce graphs of integral area *versus* analyte concentration. The equations for the calibration curves were then developed by least square linear regression so that the sample concentration could be computed directly.

### 2.2.8 Statistical Analyses

Results of pH, TA, and viable cell counts were analyzed by one-way ANOVA. The samples were compared over different times of fermentation and during various days of cold storage. Mean values were then compared using the Tukey's test at  $P < 0.05$  by Statistica software version 10.0 (StatSoft South America, SP, Brazil). For sensory analysis, the directional difference test (forced choice procedure) was used to determine the consumer's ability to detect the difference in acidity between the fermented milk samples and preferred sample (ASTM International, 2008).  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## 2.3 RESULTS AND DISCUSSION

### 2.3.1 Growth and Acidification Profile during Milk Fermentation

After 72 h of fermentation with *B. lactis* HN019, fermented milk had pH values ranging from 6.36 to 3.97, whereas TA increased from 0.22% to 1.92% lactic acid (Table 1).

**Table 1.** Growth and changes in pH and titratable acidity (TA) during milk fermentation with *B. lactis* HN019 at 37 °C. Results are expressed as mean value  $\pm$  standard deviation,  $n = 9$ .

Time (hour)	(Log CFU/mL)	pH	TA (%)
0	9.21 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	6.36 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.22 $\pm$ 0.01 <sup>k</sup>
2	9.25 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	5.72 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	0.29 $\pm$ 0.02 <sup>j</sup>
4	9.29 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	5.14 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.50 $\pm$ 0.02 <sup>i</sup>
6	9.33 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	4.91 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	0.65 $\pm$ 0.01 <sup>h</sup>
8	9.47 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	4.74 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>	0.81 $\pm$ 0.02 <sup>g</sup>
10	9.46 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	4.63 $\pm$ 0.03 <sup>f</sup>	0.98 $\pm$ 0.02 <sup>f</sup>
12	9.49 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	4.52 $\pm$ 0.03 <sup>g</sup>	1.10 $\pm$ 0.11 <sup>e</sup>
16	9.44 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	4.40 $\pm$ 0.01 <sup>h</sup>	1.18 $\pm$ 0.05 <sup>e</sup>
20	9.34 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	4.31 $\pm$ 0.01 <sup>i</sup>	1.36 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
24	9.36 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	4.25 $\pm$ 0.04 <sup>i</sup>	1.50 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
48	9.29 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	4.14 $\pm$ 0.02 <sup>j</sup>	1.71 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>
72	8.85 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	3.97 $\pm$ 0.05 <sup>k</sup>	1.92 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>

<sup>a-k</sup>Means within a column with different superscripts letters differ ( $P < 0.05$ ) among time of fermentation.

We observed that the time to complete fermentation, i.e., the time required to reach pH 4.5, was 12 h with TA of 1.1% lactic acid, demonstrating the poor acidification performance of strain HN019 when compared to that of traditional yoghurt starter cultures (Bouteille *et al.*, 2013). Nevertheless, the desired characteristics for fermented milks were reached (pH about 4.5 and titratable acidity higher than 0.6% to 2%), according to the FIL norm n° 150:1991 recommended in the Codex Alimentarius.

Despite the slow growth (Table 1), strain HN019 persisted in high levels in the milk matrix without significant multiplication until 48 h ( $P > 0.05$ ), although lactose consumption and the production of the organic acids, characteristics of fermentation, occurred (Figure 2), thus, confirming its higher tolerance to acidic conditions (Prasad *et al.*, 1998). In fact, because of this advantageous technological property, the species *B. lactis* is more suitable to be used in fermented dairy products in comparison to other *Bifidobacterium* species (Gueimonde *et al.*, 2004). The final pH of 3.97 after 72 h of fermentation and the time required to reach pH 4.5 (approximately 12 h) are in agreement with other reported data of cow milk fermented with *B. lactis* Bb12 at 37°C (Østlie *et al.*, 2003). However, another strain, *B. lactis* BL 04, persisted for the longest time to complete fermentation (16.3 h), proving that the metabolism of bifidobacteria is strain-dependent (Oliveira *et al.*, 2009).

The low pH observed after 48 h and the accumulation of organic acids probably decreased the specific growth rate of strain HN019. Usually, milk is not a suitable matrix for the growth of bifidobacteria because amino acids and low molecular weight peptides are only present at low concentrations (Prasanna *et al.*, 2014). Furthermore, other species of bifidobacteria, such as *B. animalis* subsp. *animalis*, invariably require strict anaerobiosis and a low redox potential in the early phase of growth; however, strains of *B. animalis* subsp. *lactis* exhibit elevated oxygen tolerance, allowing multiplication at a higher rate under non-anaerobic conditions (Meile *et al.*, 1997; Masco *et al.*, 2004).

In this context, *B. lactis* HN019 has showed an excellent survival rate (93.25%) after 72 h, and the concentrations (up to 9 logs) since the first hours were around one logarithmic cycle highest to those reported by other authors who evaluated different *B. lactis* strains at 37°C (Østlie *et al.*, 2003, Prasanna *et al.*, 2012). The observed stationary phase since the beginning and the high probiotic counts can be attributed to the inoculation method (DVI) adopted in this study, which is similar to the industrial or commercial process. In fact, as bifidobacterial cultures are supplied in a highly concentrated form, usually meant for Direct Vat Set (DVS) application, the use of these DVS cultures avoids the need for propagating this culture at the production site. We herein noted that this DVS method presented highest counts and rate of acidification compared to a previous study by our group using DVI for *B. lactis* HN019 as the pre-culture (10% v/v) added to skim milk (Bernini *et al.*, 2016).

Finally, in order to be functional, bifido milk should contain viable bifidobacteria in high numbers during production and storage (Sreeja and Prajapati, 2015). Although minimal effective doses should be established for each probiotic product, because probiotic effects are strain-specific and may vary depending on the population group and health status (Bertazzoni *et al.*, 2013), *B. lactis* HN019 was detected above the recommended levels in many studies that indicates at least  $10^8$  and  $10^9$  CFU per serving in the product to be consumed (Shah, 2000; Bernini *et al.*, 2016; Meng *et al.*, 2016).

### 2.3.2 Cold storage viability and post-acidification

*B. lactis* HN019 showed high viability over 30 days of refrigerated storage as samples had counts above 9 log CFU/mL throughout the storage period. The strain remained stable throughout 30 days and was not affected by storage time ( $P > 0.05$ ; Table 2). These constant counts recorded during the shelf life are similar to those reported by other studies involving

milk fermented with *B. lactis* BB-12 and *B. lactis* BL 04 (Oliveira *et al.*, 2009; Casarotti *et al.*, 2014).

**Table 2.** Stability (pH, titratable acidity (TA) and viable cell counts) of a ferment milk by *B. lactis* HN019 (for 12 hours) during cold storage (30-day refrigerated at 4 °C). Results are expressed as mean value  $\pm$  standard deviation, n = 9.

Parameter	Storage time (days)					
	0	1	7	14	21	30
Counts (Log CFU/mL)	9.28 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	9.30 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	9.12 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	9.24 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	9.25 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	9.13 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>
pH	4.49 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	4.55 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	4.56 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	4.51 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	4.56 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	4.56 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
TA (%)	1.07 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	1.08 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	1.09 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	1.15 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	1.17 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	1.18 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>

<sup>a-b</sup>Means within a row with different superscripts letters differ (P < 0.05) among days of storage.

According to Russel *et al.* (2011), an important property of a probiotic culture is the ability to survive in the carrier material, as this ensures that the probiotic bacteria remain viable and retain their metabolic activity. *B. animalis* subsp. *lactis* persisted significantly longer in fermented milk under different conditions compared to *B. longum* and *B. infantis* (Jayamanne and Adams, 2009; Florence *et al.*, 2016). These data indicate that strains of *B. lactis*, such as HN019, used in this study, exhibit a high ability to withstand environmental stress conditions, such as acidic environment and low temperatures.

The pH of the fermented milk remained stable and acidity was maintained after 30 days of cold storage, as a low rate of post-acidification was observed without statistical significance (P > 0.05; Table 2). Post-acidification is an important factor for the shelf life of fermented milks because survival of probiotics is affected considerably by pH and TA of the products (Mortazavian *et al.*, 2010). A very low pH value increases the concentration of undissociated organic acids in fermented products, thereby enhancing the bactericidal effect of these acids (Tripathi and Giri, 2014).

### 2.3.3 Sensory analysis

Bacteria of the genus *Bifidobacterium* usually produce high concentration of components that may contribute negatively to taste and aroma, e.g., vinegar flavor (Mohammadi *et al.*, 2011). Therefore, we evaluated whether consumers could identify higher acidity with the fermentation time and the effect of acidification on sensory preference of the probiotic milk.

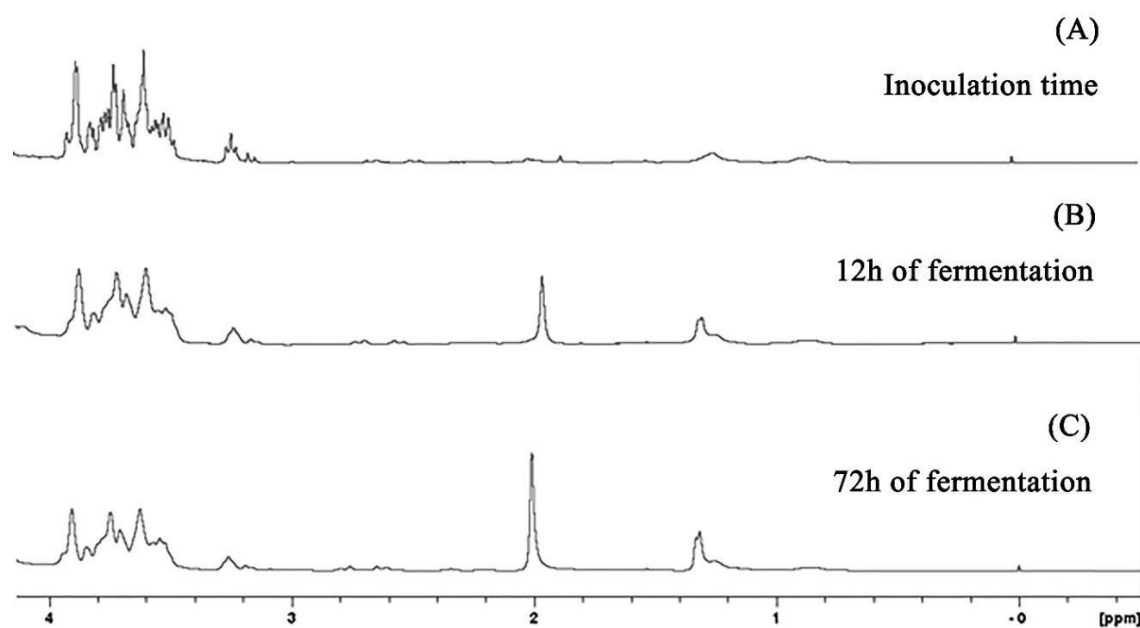
The forced choice test of both probiotic milks after 8 h and 72 h of fermentation showed a significant difference ( $P < 0.05$ ) between the samples. A high number of panelists (88.75%) detected higher acidity as the fermentation time increased (72 h of fermentation). Additionally, 62.5% of panelists preferred the less acidic sample (8 h of fermentation).

Regarding the purchase intention for the milk fermented for 8 h, 65% of the panelists voted as “may or may not buy”, “probably buy”, or “definitely buy” the product (sum of scores 3, 4, and 5 of purchase intention test, respectively), whereas 35% of the panelists voted as would “probably not buy” and “definitely not buy” for the product (sum of scores 1 and 2). In contrast, for the milk fermented for 72 h, 52.5% of the panelists voted as “probably not buy” and “definitely not buy” for the product. These results indicate that the development of fermented milk by *B. lactis* HN019 for 8 h of fermentation had a higher acceptability than that for milk fermented for 72 h and may be preferable because of its desirable sensory characteristics compared to those of milk fermented for a long period, whose acetic acid concentration is higher (Figure 2A).

Additionally, organoleptic effects of the in-bottle sterilization treatment used in this study included a sterilized-caramelized flavor and browning caused by the Maillard reaction. In this case, both effects are desired as the slightly caramelized flavor of fluid fermented milk is appreciated by consumers, and the yellowish coloring exempts the use of added colorants.

### 2.3.4 Determination of organic acids and lactose in fermented milk by *in situ* $^1\text{H}$ NMR

The selected proton NMR signals for this study were integrated within the chemical shifts (resonances) ranges of  $\delta$  1.20–1.40 (methyl protons of lactic acid),  $\delta$  1.85–2.05 (methyl protons of acetic acid), and  $\delta$  3.85–3.20 (lactose). The assignments of these chemical shifts were in agreement to the NMR data reported for reference samples of the same compounds (Nord *et al.*, 2004; Bouteille *et al.*, 2013). Figure 1 shows the spectra of milk samples at different times after bifidobacterial inoculation. In these spectra, acetic and lactic acid resonance intensities increased with time, whereas lactose resonance intensities decreased with time.



**Figure 1.** *In situ* quantitative proton nuclear magnetic resonance spectra of milk under fermentation by *B. lactis* HN019 at 37°C recorded at inoculation time (A), 12 hours (B) and 72 hours after inoculation (C). The area of the resonance of the doublet at 1.33 ppm (lactic acid), as well the area of the singlet at 2.00 ppm (acetic acid) increases with time while the area of the resonance between 4.00 ppm and 3.11 ppm (lactose) decreases with time of fermentation.

To determine the concentration of these metabolites, calibration curves were prepared, and the areas of the following  $^1\text{H}$  NMR signals were then used as a function of the concentration of each metabolite for integral calibration: the doublet at 1.32 ppm (lactic acid); the singlet at 1.97 ppm (acetic acid), and the triplet at 3.25 ppm (lactose). Equations were formulated using the linear least square regression method and used for separately computing the concentration of lactic acid, acetic acid, and lactose in fermented milk.

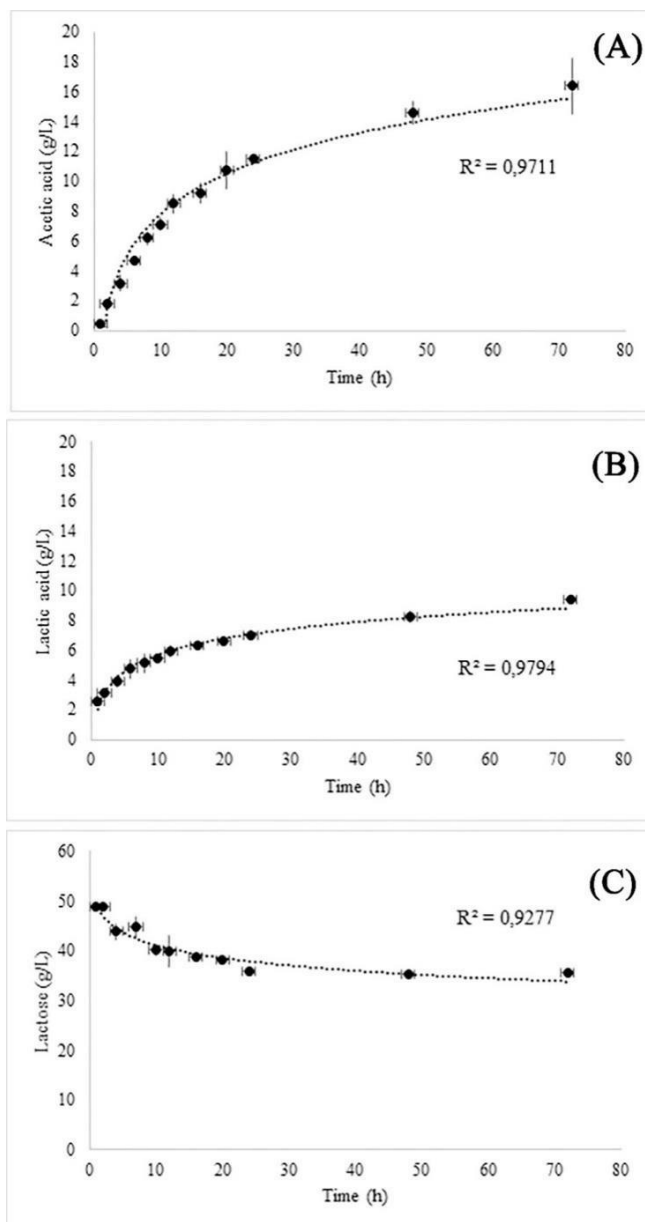
It is important to note that lactic and acetic acid and lactose yielded signals in regions relatively free from other signals and, consequently, allowed their accurate quantification by integration of the spectrum of the milk samples. However, when there are small drifts in chemical shift for a signal between spectra due to, for instance, pH variations, as observed in the fermented milk of this study, there may be high integration errors if the same integration range is used for all spectra (Bharti and Roy, 2012). We concluded that the best result was obtained when each signal was manually integrated in each individual spectrum.

The calculated quantities of each metabolite are displayed in Figure 2. High correlations were obtained for organic acids ( $R^2 = 0.97$ ), whereas for lactose, the correlation was slightly lower ( $R^2 = 0.92$ ). Both organic acids linearly increased during the examination period. However, lactose consumption reached a plateau at around 48 h of fermentation. The shapes of the curves reflected bacterial growth, and the profiles observed closely resembled the profiles previously reported by Bouteille *et al.* (2013), who first quantified lactate and lactose concentrations in dairy gels (yoghurt) by isq  $^1\text{H}$  NMR.

Acetic acid was the main metabolite produced throughout the fermentation period, ranging from  $0.47 \pm 0.06$  g/L to  $16.36 \pm 1.86$  g/L at the end of 72 h (Figure 2A). To the best of our knowledge, this is the first study to quantify acetate in milk by isq  $^1\text{H}$  NMR. Our measurements showed a higher production of acetate by *B. lactis* HN019 compared to that by other bifidobacteria strains evaluated at the same temperature (Chick *et al.*, 2001; Østlie *et al.*,

2003). From the sensory point of view, acetic acid can be an undesirable end product in fermented milk as high amounts result in harshness and in a “vinegary” flavor. A longer fermentation time and, consequently, additional acetic acid production had a lower acceptability among panelists in our sensory analysis. However, in terms of health, acetate is the main short chain fatty acid (SCFA) in the colon and can be used as a nutrient for the colonic epithelium and as a modulator of colonic and intracellular pH, cell volume, and other functions (Hijova and Chmelarova, 2007).

In contrast, lactic acid is a milder, sweeter acid that does not generate objectionable flavor (Nguyen *et al.*, 2012). The initial concentration of lactic acid was  $2.59 \pm 0.10$  g/L (Figure 2B). This lactate content in unfermented skim milk was higher than that typically reported in literature (Østlie *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2012). The mean of the final concentrations of lactic acid was  $9.40 \pm 0.18$  g/L. According Østlie *et al.* (2003), a satisfactory fermented probiotic milk product with the appropriate aroma and flavor should contain approximately 8 g/L of lactate. However, only after 48 h, *B. lactis* HN019 reached concentrations of 8.24 g/L. In fact, utilization of the bifidus pathway by bifidobacteria is less efficient in producing lactic acid, and such an extended period of 48 h of fermentation would be inconvenient from the viewpoint of production. Therefore, *Bifidobacterium* strains are often incorporated as co-cultures into fermented dairy products, such as yoghurt, which is fermented by ordinary LAB starters, such as *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Prasanna *et al.*, 2014).



**Figure 2.** Concentration, in g/L, of produced acetic acid (A) and lactic acid (B) and of consumed lactose (C) during milk fermentation with *B. lactis* HN019 at 37°C for 72 hours. Results are expressed as the mean values of the three replicates  $\pm$  standard deviation.

The production of organoleptically acceptable and stable probiotic fermented milks can be improved by determining the produced important metabolic products and their concentrations (Østlie *et al.*, 2003). It has been suggested that one of the main mechanisms of inhibition by bifidobacteria is related to the fermentative production of acids, such as acetate and lactate (Makras and Vuyst, 2006). The average ratio of acetate to lactate (ratio A/L) in this study at the end of 12 h incubation was 1.48, whereas the A/L ratio at the end of 24 and 72 h were 1.64 and 1.74, respectively. Therefore, the A/L ratio increased as fermentation continued due to the increase in the rate of acetate production. The A/L ratio at 12 h of fermentation was in agreement with the theoretical yield of 1.5 mol acetic acid and 1 mol lactic acid mentioned in literature (Scardovi *et al.*, 1971). However, this also concurs with previous studies that demonstrated strain-dependence in producing these two main organic acids by bifidobacteria (Palframan *et al.*, 2003; Van der Meulen *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2012).

Finally, the content of lactose ranged from  $48.9 \pm 0.25$  g/L to  $35.48 \pm 0.70$  g/L after 72 h (Figure 2C). These values were in good agreement with lactose measurements by NMR by Hu *et al.* (2007) and Bouteille *et al.* (2013). Lactose is the primary substrate for acid production in milk; however, fermentation is not limited by the amount of lactose available but by the production of organic acids and the concomitant lowering of pH, which increasingly inhibits the microorganism long before lactose is exhausted (Narvhus *et al.*, 1998). Normally, growth and metabolism mostly cease after 24 h of incubation; however, it has been established that growth and metabolism can be uncoupled (Østlie *et al.*, 2003). Although incomplete utilization of lactose was observed in this study, production of organic acids by *B. lactis* HN019 occurred up to 72 h and cessation of growth was observed after 48 h (Table 1). These results indicate that organic acid production was uncoupled from the growth of strain HN019.

## 2.4 CONCLUSION

Herein, *B. lactis* HN019 showed a long fermentation time in milk when compared to industrial starter cultures (i.e., *S. thermophilus* and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), with a high content of acetate production throughout fermentation. The level of acetic acid after 8 h of fermentation culminated in a product with the best sensory acceptability, whereas long fermentation (72 h), in fact, generated defects typical of the metabolism of bifidobacteria with high acidity and vinegary flavor. However, tolerance of the strain toward low pH and end products was high ( $>8.85$  log CFU/mL) at 72 h of fermentation. In addition, the strain showed high survival during cold storage for 30 days and reduced post-acidification ( $P > 0.05$ ). Our findings show the efficiency of *B. lactis* HN019 as a fermenting bacterium through its production of acids. The study of strain metabolism allowed us to better understand the flavor variations in the fermented milk, as the production of acetic or lactic acid determines the acceptance of the fermented product. We also highlighted the importance of controlling the fermentation time because *Bifidobacterium* strains produce different amounts of metabolic products after a defined fermentation time. Although other analytical techniques for acid quantification have already been consolidated, this study also confirms that isq  $^1\text{H}$  NMR is a simple and nondestructive method that yielded robust results for lactic and acetic acid and lactose content.

## 2.5 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the CNPq for the support through the project (142385/2014-0). We also acknowledge the support of Laboratório Multiusuário de Espectroscopia/SPEC-RMN - Universidade Estadual de Londrina and Confepar Agro-industrial Cooperativa Central for donation of skim milk powder.

**REFERENCES**

- AOAC. 2012. Official Methods of Analysis International, 19th ed. Gaithersburg, MD: Association of Analytical Chemists.
- Ahmed, M., Prasad, J., Gill, H. S., Stevenson, L. and Gopal, P. K. 2007. Impact of consumption of different levels of *Bifidobacterium lactis* HN019 on the intestinal microflora of elderly human subjects. *Journal Nutrition Health Aging* 11(1): 26-31.
- ASTM. 2008. ASTM Standard E2164-08 Standard Test Method for Directional Difference Test. West Conshohocken, PA: ASTM.
- Bernini, L. J., Simão, A. N., Alfieri, D. F., Lozovoy, M. A., Mari, N. L., de Souza, C. B, Dichi, I. and Costa, G. N. 2016. Beneficial effects of *Bifidobacterium lactis* on lipid profile and cytokines in patients with metabolic syndrome: A randomized trial. *Nutrition* 32(6): 716-719.
- Bertazzoni, E., Donelli, G., Midtvedt, T., Nicoli, J. and Sanz, Y. 2013. Probiotics and clinical effects: is the number what counts? *Journal of Chemotherapy* 25(4): 193-212.
- Bharti, S. K. and Roy, R. 2012. Quantitative <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Trends in Analytical Chemistry* 35: 5–26.
- Bogsan, C., Ferreira, L., Maldonado, C., Perdigon, G., Almeida, S. and Oliveira, M. 2014. Fermented or unfermented milk using *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019: Technological approach determines the probiotic modulation of mucosal cellular immunity. *Food Research International* 64: 283-288.
- Bouteille, R., Gaudet, M., Lecanu, B. and This, H. 2013. Monitoring lactic acid production during milk fermentation by in situ quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Dairy Science* 96(4): 2071-2080.

- Casarotti, S. N., Monteiro, D. A., Moretti, M. S. and Penna, A. B. 2014. Influence of the combination of probiotic cultures during fermentation and storage of fermented milk. *Food Research International* 59: 67-75.
- Castele, S. V., Vanheuverzwijn, T., Ruysen, T., Van Assche, P., Swings, J. and Huys, G. 2006. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. *International Dairy Journal* 16(12): 1470–1476.
- Chick, H., Shin, H. S. and Ustunol, Z. 2001. Growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria grown in skim milk containing honey. *Journal of Food Science* 66(3): 478-481.
- Dekker, J. W., Wickens, K., Black, P. N., Stanley, T. V, Mitchell, E. A., Fitzharris, P., Tannock, G. W., Purdie, G. and Crane, J. 2009. Safety aspects of probiotic bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 in human infants aged 0–2 years. *International Dairy Journal* 19(3): 149–154.
- Florence, A. R., Oliveira, M. N., Delile, A. and Béal, C. 2016. Survival of *Bifidobacterium* strains in organic fermented milk is improved as a result of membrane fatty acid composition. *International Dairy Journal* 61: 1-9.
- Gopal, P., Prasad, J., Smart, J. and Gill, H. 2001. *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 67(3): 207-216.
- Gowda, G. N. and Raftery, D. 2015. Can NMR solve some significant challenges in metabolomics? *Journal of Magnetic Resonance* 260: 144-160.

- Gueimonde, M., Delgado, S., Mayo, B., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A. and de los Reyes-Gavilán, C. 2004. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milk. *Food Research International* 37(9): 839-850.
- Hijova, E. and Chmelarova, A. 2007. Short chain fatty acids and colonic health. *The International Journal Bratislava Medical Journal* 108(8): 354-358.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., ... and Sanders, M. E. 2014. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 11(8): 506-514.
- Hu, F., Furihata, K., Kato, Y. and Tanokura, M. 2007. Nondestructive quantification of organic compounds in whole milk without pretreatment by two-dimensional NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(11): 4307-4311.
- Jayamanne, V. S. and Adams, M. R. 2009. Modelling the effects of pH, storage temperature and redox potential (Eh) on the survival of bifidobacteria in fermented milk. *International Journal of Food Science and Technology* 44(6): 1131–1138.
- Makras, L. and Vuyst, L. C. 2006. The *in vitro* inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *International Dairy Journal* 16(9): 1049–1057.
- Masco, L., Ventura, M., Zink, R., Huys, G. and Swings, J. 2004. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54(4): 1137–1143.

- Mayo, B., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Pablo Álvarez-Martín, P. and Bardowski, J. 2010. Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. In: Mozzi, F. (Ed.), *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel Applications*, p. 3-33. Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Meile, L., Ludwig, W., Rueger, U., Gut, C., Kaufmann, P., Dasen, G., Wenger, S. and Teuber, M. 1997. *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *Systematic and Applied Microbiology* 20(1): 57-64.
- Meng, H., Lee, Y., Ba, Z., Peng, J., Lin, J., Boyer, A., Fleming, J. A., ... and Rogers, J. 2016. Consumption of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 impacts upper respiratory tract infection and the function of NK and T cells in healthy adults. *Molecular Nutrition & Food Research* 60(5): 1161-1171.
- Miller, L. E., Lehtoranta, L. and Lehtinen, M. J. 2017. The effect of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* HN019 on cellular immune function in healthy elderly subjects: Systematic review and meta-analysis. *Nutrients* 9: E191.
- Mohammadi, R., Mortazavian, A., Khosrokhavar, R. and Cruz, A. G. 2011. Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. *Annals of Microbiology* 61(3): 411-424.
- Mortazavian, A. M., Khosrokhavar, R., Rastegar, H. and Mortazaei, G. R. 2010. Effects of dry matter standardization order on biochemical and microbiological characteristics of freshly made probiotic Doogh. *Italian Journal of Food Science* 22(1): 98-104.
- Narvhus, J. A., Østeraas, K., Mutukumira, T. and Abrahamsen, R. K. 1998. Production of fermented milk using a malty compound-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, isolated from Zimbabwean naturally fermented milk. *International Journal of Food Microbiology* 41(1): 73-80.

- Nguyen, T. P., Lee, Y. K. and Zhou, W. 2012. Effect of high intensity ultrasound on carbohydrate metabolism of bifidobacteria in milk fermentation. *Food Chemistry* 130(4): 866–874.
- Nord, L. I., Vaag, P. and Duus, J. Ø. 2004. Quantification of organic and amino acids in beer by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Analytical Chemistry* 76(16): 4790-4798.
- Oliveira, R. S., Perego, P., Converti, A. and Oliveira, M. N. 2009. Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with *Streptococcus thermophilus*: The effect of inulin. *LWT - Food Science and Technology* 42(5): 1015–1021.
- Østlie, H. M., Helland, M. H. and Narvhus, J. A. 2003. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. *International Journal of Food Microbiology* 87(1-2):17-27.
- Palframan, R. J., Gibson, G. R. and Rastall, R. A. 2003. Carbohydrate preferences of *Bifidobacterium* species isolated from the human gut. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 4(2): 71-75.
- Prasad, J., Gill, H, Smart, J. and Gopal, P. M. 1998. Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *International Dairy Journal* 8(12): 993-1002.
- Prasanna, P. P., Grandison, A. S. and Charalampopoulos, D. 2012. Effect of dairy-based protein sources and temperature on growth, acidification and exopolysaccharide production of *Bifidobacterium* strains in skim milk. *Food Research International* 47(1): 6–12.
- Prasanna, P. P., Grandison, A. S. and Charalampopoulos, D. 2014. Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. *Food Research International* 55: 247-262.

- Russel, D. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. and Stanton, C. 2011. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* 149(1): 88-105.
- Sanders, M. E. 2006. Summary of probiotic activities of *Bifidobacterium lactis* HN019. *Journal of Clinical Gastroenterology* 40(9): 776-783.
- Scardovi, V., Trovatelli, D., Zani, G., Crociani, F. and Matteuzzi, D. 1971. Deoxyribonucleic acid homology relationships among species of the genus *Bifidobacterium*. *Journal of Systematic Bacteriology* 21: 276-294.
- Shah, N. P. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *Journal of Dairy Science* 83(4): 894–907, 2000.
- Shu, Q. and Gill. H. S. 2001. A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HN019) reduces the severity of *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *Medical Microbiology and Immunology* 189(3): 147-152.
- Sreeja, V. and Prajapati, J. B. 2015. Bifidus milks. In: A. K. Puniya (Ed.), *Fermented Milk and Dairy Products*, p. 269-310. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Tripathi, M. K. and Giri, S. K. 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods* 9: 225-241.
- Urita, Y., Goto, M., Watanabe, T., Matsuzaki, M., Gomi, A., Kano, M. Miyazaki, K. and Kaneko, H. 2015. Continuous consumption of fermented milk containing *Bifidobacterium bifidum* YIT 10347 improves gastrointestinal and psychological symptoms in patients with functional gastrointestinal disorders. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* 34(2): 37-44.
- Talwalkar, A. and Kailasapathy, K. 2006. A Review of Oxygen Toxicity in Probiotic Yogurts: Influence on the Survival of Probiotic Bacteria and Protective Techniques. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3(3): 117-124.

- Van der Meulen, R., Adriany, T., Verbrugghe, K. and Vuyst, L. 2006. Kinetic analysis of bifidobacterial metabolism reveals a minor role for succinic acid in the regeneration of NAD<sup>+</sup> through its growth-associated production. *Applied and Environmental Microbiology* 72(8): 5204–5210.
- Waller, P. A., Gopal, P. K., Leyer, G. J., Ouwehand, A. C., Reifer, C., Stewart, M. E. and Miller, L. E. Dose-response effect of *Bifidobacterium lactis* HN019 on whole gut transit time and functional gastrointestinal symptoms in adults. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 49(9): 1057-1064.
- Zhou, J. S. and Gill, H. S. 2005. Immunostimulatory probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium lactis* HN019 do not induce pathological inflammation in mouse model of experimental autoimmune thyroiditis. *International Journal of Food Microbiology* 103(1): 97-104.

### **CAPÍTULO 3 – *IN VITRO* EFFECTS OF *Bifidobacterium lactis*-BASED SYNBIOTICS ON HUMAN FAECAL BACTERIA**

Fernanda C. Henrique-Bana<sup>a,b,\*</sup>, Xuedan Wang<sup>a</sup>, Giselle N. Costa<sup>c</sup>, Wilma A. Spinosa<sup>b</sup>,  
Eleonora Scorletti<sup>d,e,f</sup>, Philip C. Calder<sup>d,e</sup>, Christopher D. Byrne<sup>d,e</sup>, Glenn R. Gibson<sup>a</sup>

#### **Affiliations:**

<sup>a</sup> Department of Food and Nutritional Sciences, The University of Reading, Reading RG6 6AP, UK.

<sup>b</sup> Department of Food Science and Technology, State University of Londrina, Celso Garcia Cid Road, Km 380, 86051-970 Londrina, PR, Brazil.

<sup>c</sup> Program of Master in Dairy Science and Technology, University Pitágoras Unopar, Rua Marselha, 591, 86041-140 Londrina, PR, Brazil.

<sup>d</sup> Nutrition and Metabolism, Human Development and Health, Faculty of Medicine, University of Southampton, Southampton SO16 6YD, UK.

<sup>e</sup> National Institute for Health Research Southampton Biomedical Research Centre, University of Southampton and University Hospital Southampton National Health Service (NHS) Foundation Trust, Southampton SO16 6YD, UK.

<sup>f</sup> Department of Gastroenterology, University of Pennsylvania, Perelman School of Medicine, Philadelphia, PA, USA.

**\*Corresponding author:** Fernanda C. Henrique-Bana

E-mail address: ferchenrique@gmail.com

## ABSTRACT

Synbiotic supplements contain pre- and probiotics and are used to modulate gut microbiota composition. This study aimed to investigate the effects of two synbiotic mixtures on human faecal bacteria *in vitro*. Short chain fructooligosaccharides (FOS) (1% w/v) combined with either *Bifidobacterium lactis* Bb12 or *Bifidobacterium lactis* HN019 (10<sup>6</sup> colony-forming units (CFU)/mL)] were added to pH-controlled anaerobic batch cultures inoculated with human faeces. Maltodextrin, FOS and the probiotic strains were also tested. Effects on bacteria levels, short-chain fatty acids (SCFAs) and a branched-chain fatty acid (BCFA) were assessed over 48 hours. With maltodextrin, FOS and the synbiotic mixtures, there was a significant increase in total bacteria and bifidobacteria numbers, compared to the negative control or probiotics alone. Increases in *Atopobium* cluster and *Clostridium coccooides-Eubacterium rectale* group occurred with FOS and maltodextrin, respectively. Additionally, maltodextrin, FOS and synbiotics resulted in a greater production of acetate and butyrate (SCFAs) compared to the negative control and probiotics alone, whereas concentrations of iso-valerate (BCFA) were lower with these treatments. In conclusion, synbiotic-induced *in vitro* bacterial changes and changes in SCFAs production were not different from those observed with FOS alone. These data suggest that metabolic effects of these synbiotics are largely induced by the prebiotic component.

*Keywords:* Probiotic, Prebiotic, Faecal microbiota, Batch culture system.

## 3.1 INTRODUCTION

In recent years, studies have indicated that probiotics, prebiotics and their combination (synbiotics) may contribute to the maintenance or improvement of health and prevention of diseases by modifying the gut microbiota (Pandey, Naik, & Vakil, 2015; Markowiak & Slizewska, 2017; Hady et al., 2018). Probiotics are defined as ‘live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host’ (Hill et al., 2014). Prebiotics also target gut microbiota with the goal of improving health. Whereas probiotics are

live microorganisms, a prebiotic is ‘a substrate that is selectively utilized by host microorganisms conferring a health benefit’ (Gibson et al., 2017). Thus, prebiotics serve as nutrients for beneficial microorganisms harboured by the host, including administered probiotic strains and indigenous (resident) microorganisms (Gibson et al., 2017).

A number of fermentable carbohydrates have been reported to convey health benefits to the host, but fructooligosaccharides (FOS) and galactooligosaccharides (GOS) currently dominate the prebiotic category (Gibson et al., 2017). These oligosaccharides selectively promote beneficial microorganisms within the gut microbiota, such as bifidobacteria, and increase production of short-chain fatty acids (SCFAs) (Salazar et al., 2015; Simpson & Campbell, 2015). These SCFAs are crucial for intestinal health and can also influence sites distant to the gut (Gibson et al., 2017).

*In vivo* and *in vitro* studies have shown the positive effects of certain synbiotics (Krumbeck, Walter, & Hutkins, 2018); however, the development of effective synbiotic combinations remains a challenging issue. *Bifidobacterium lactis* BB12 and *B. lactis* HN019 are widely used bifidobacterial strains in fermented dairy production due to their purported health-promoting properties on human hosts (Jungersen et al., 2014; Meng et al., 2016). The combination of *B. lactis* BB12 and FOS, a well-documented prebiotic, was chosen for the INSYTE study ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) registration number NCT01680640), a unique proof-of-concept double blind, randomised, placebo controlled clinical trial with a 10–14 month intervention, testing the effects of this synbiotic treatment in patients with non-alcoholic fatty liver disease (Scorletti et al., 2018). The aim of the present study was to investigate whether two *Bifidobacterium* strains, both combined with FOS, are more effective than maltodextrin, FOS or probiotics alone, using an *in vitro* fecal bacterial culture system. The potential fermentation properties of two synbiotic mixtures were explored using pH-controlled anaerobic faecal batch cultures. We also quantified changes in levels of selected microbial groups,

changes in SCFA production, and tested relationships between changes in SCFAs and variations in microbial populations.

## **3.2 MATERIAL AND METHODS**

### **3.2.1 Substrates**

Maltodextrin and FOS with a degree of polymerization < 10 were supplied by Chr. Hansen, Hørsholm, Denmark. Freeze-dried *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 (DuPont-Danisco, Madison, USA) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 (Chr. Hansen, Hørsholm, Denmark) were stored at -80°C. Plates of de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) agar (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) were inoculated with the bifidobacterial strains and incubated at 37°C in an anaerobic chamber (10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub> and 80% N<sub>2</sub>, Don Whitley Scientific Ltd, Shipley, UK). After incubation, bottles containing 9 mL of MRS broth were then inoculated with one colony from each plate, and incubated for 24 h under the same conditions, as mentioned above.

### **3.2.2 Faecal Sample Preparation**

Faecal samples were collected from three healthy individuals (2 women and 1 man aged between 25 and 35 years) who had not taken antibiotics, probiotics or prebiotics for at least six months before the faecal collection, and who had no history of gastrointestinal disorders. Faecal samples were collected, on site, on the day of the experiment and placed in an anaerobic jar (AnaeroJar™ 2.5L, Oxoid Ltd), including a gas-generating kit (AnaeroGen™, Oxoid). Then, samples were prepared as reported by Guergoletto et al. (2016). Fifteen mL of the resulting faecal slurries were immediately used to inoculate the batch-culture systems.

### 3.2.3 *In vitro* Batch Culture Fermentation

Sterile stirred batch culture fermentation vessels (300 mL working volume) were prepared and aseptically filled with 135 mL of sterile basal nutrient medium, prepared as reported by Guergoletto et al. (2016). Once in the fermentation vessels, sterile medium was maintained under anaerobic conditions by sparging the vessels with O<sub>2</sub>-free N<sub>2</sub> overnight (15mL/min). The temperature was held at 37°C using a circulating water bath and pH values controlled between 6.7 and 6.9 using an automated pH controller (Fermac 260; Electrolab, Tewkesbury, UK) which added acid or alkali as required (0.5 M HCl and 0.5 M NaOH).

Seven vessels were prepared for different treatments: maltodextrin (1% w/v), FOS (1% w/v), *B. lactis* Bb12 (10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup>), *B. lactis* HN019 (10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup>), FOS combined with *B. lactis* Bb12 (Syn 1), FOS combined with *B. lactis* HN019 (Syn 2) at the same concentrations as when used alone and negative control (without any added substrate or microorganism). Seven batch culture fermenters were thus run in parallel and the experiment was performed in triplicate, using one faecal sample given by a different donor for each run of seven batch fermenters. The probiotics and carbohydrates were added to each vessel just before the addition of 15 mL (1:10, w/v) of fresh faecal slurry. Batch cultures were conducted for 48 h, and 4 mL samples obtained from each vessel at 0, 8, 24 and 48 h for analyses.

### 3.2.4 Enumeration of Bacterial Populations by FISH Analysis

Fluorescence in situ hybridisation (FISH) analysis by flow cytometry was performed as described by Daims, Stoecker, & Wagner (2005). Briefly, aliquots (750 µL) of batch culture samples were centrifuged at 1136 × g for 5 min. Pellets were suspended in 375 µL filtered 0.1 M Phosphate-buffered saline (PBS) solution. Filtered 4% paraformaldehyde (PFA) (1125 µl) was added and samples were stored at 4°C for 4 h. Samples were then washed twice with PBS to remove PFA and re-suspended in a mixture containing 300 µl PBS and 300 µl 99% ethanol.

Samples were then stored at -20°C, until used for hybridization as described by Wang et al. (2019). The probes used (Sigma Aldrich Ltd, Poole, UK) are listed in Table 1.

**Table 1.** Name, sequence, and target group of oligonucleotide probes used for Fluorescence in situ hybridization of bacterial enumeration. +: These probes are used together in equimolar concentration of 50 ng/μL.

Probe name	Sequence (5' TO 3')	Target group	References
Non Eub	ACTCCTACGGGAGGCAGC	Control probe complementary to EUB338	(Wallner et al., 1993)
Eub338 I +	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Most bacteria	(Daims et al., 1999)
Eub338 II +	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	Planctomycetales	(Daims et al., 1999)
Eub338 III +	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	Verrucomicrobiales	(Daims et al., 1999)
Bif164	CAT CCG GCA TTA CCA CCC	<i>Bifidobacterium</i> spp.	(Langendijk et al., 1995)
Lab158	GGTATTAGCAYCTGTTTCCA	<i>Lactobacillus</i> and <i>Enterococcus</i>	(Harmsen et al., 1999)
Bac303	CCA ATG TGG GGG ACC TT	Most <i>Bacteroidaceae</i> and <i>Prevotellaceae</i> , some <i>Porphyromonadaceae</i>	(Manz et al., 1996)
Erec482	GCT TCT TAG TCA RGT ACCG	Most of the <i>Clostridium coccoides-Eubacterium rectale</i> group ( <i>Clostridium</i> clusters XIVa and XIVb)	(Franks et al., 1998)
Rrec584	TCA GAC TTG CCG YAC CGC	<i>Roseburia</i> genus	(Walker et al., 2005)
Ato291	GGT CGG TCT CTC AAC CC	<i>Atopobium</i> cluster	(Harmsen et al., 2000)
Prop853	ATT GCG TTA ACT CCG GCAC	Clostridial cluster IX	(Walker et al., 2005)
Fprau655	CGCCTACCTCTGCACTAC	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> and related sequences	(Suau et al., 2001)
DSV687	TAC GGA TTT CAC TCC T	<i>Desulfovibrio</i> genus	(Ramsing et al., 1996)
Chis150	TTATGCGGTATTAATCTYCCTTT	Most of the <i>Clostridium histolyticum</i> group ( <i>Clostridium</i> clusters I and II)	(Franks et al., 1998)
CFB286	GTAGGGGTCTTGAGAGGA	<i>Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides</i>	(O'Sullivan et al., 2002)

### 3.2.5 SCFA Analysis

SCFAs were measured by gas chromatography as previously reported by Richardson et al. (1989). Aliquots of 1 mL of sample supernatant were transferred into glass tubes with 50 μL of 2-ethylbutyric acid (0.1 M, internal standard) (Sigma, Poole, UK). 500 μL of concentrated hydrochloric acid (HCl) and 2 mL of diethyl ether (Sigma Aldrich Ltd., Poole, UK) were added to each glass tube and samples vortexed for 1 min. Samples were centrifuged at 2000 x g for 10 min. The diethyl ether (upper) layer of each sample was transferred to a labelled clean glass tube. A second extraction was conducted by adding another 0.5 ml diethyl ether, followed by vortexing and re-centrifugation. The diethyl ether layers were pooled. 400 μl of pooled ether extract and 50 μl N-(tert-butyltrimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA)

(Sigma-Aldrich, Poole, UK) were added into a GC screw-cap vial. Samples were left at room temperature for 72 h to allow lactic acid in the samples to completely derivatise.

An Agilent/HP 6890 Gas Chromatograph (Hewlett Packard, UK) fitted with a HP-5MS 30 m × 0.25 mm column with a 0.25 µm coating (Crosslinked (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane, Hewlett Packard, UK) was used for analysis of derivatised SCFAs. Temperatures of injector and detector were 275°C. The column was programmed to increase in temperature from 63°C to 190°C at a rate of 15°C min<sup>-1</sup> and was then held at 190°C for 3 min. Helium was the carrier gas (flow rate 1.7 ml min<sup>-1</sup>; head pressure 133 KPa). A split ratio of 100:1 was used. Quantification of the samples was obtained through calibration curves of lactic, acetic, propionic, butyric, valeric, iso-butyric and iso-valeric acids at concentrations between 12.5 and 100 mM.

### 3.2.6 Statistical Analysis

Differences within each treatment were evaluated after 8, 24 and 48 h of fermentation compared with baseline (0 h of fermentation) using paired Student's t-tests and were considered significantly different from baseline when  $P \leq 0.05$ . The data were then analysed to compare different treatments at the same time point using the post hoc analysis (Tukey test) and  $P \leq 0.05$  to indicate significance. Analyses were performed using Statistica software version 10.0 (Statsoft South America).

## 3.3 RESULTS

### 3.3.1. Bacterial Enumeration by FISH

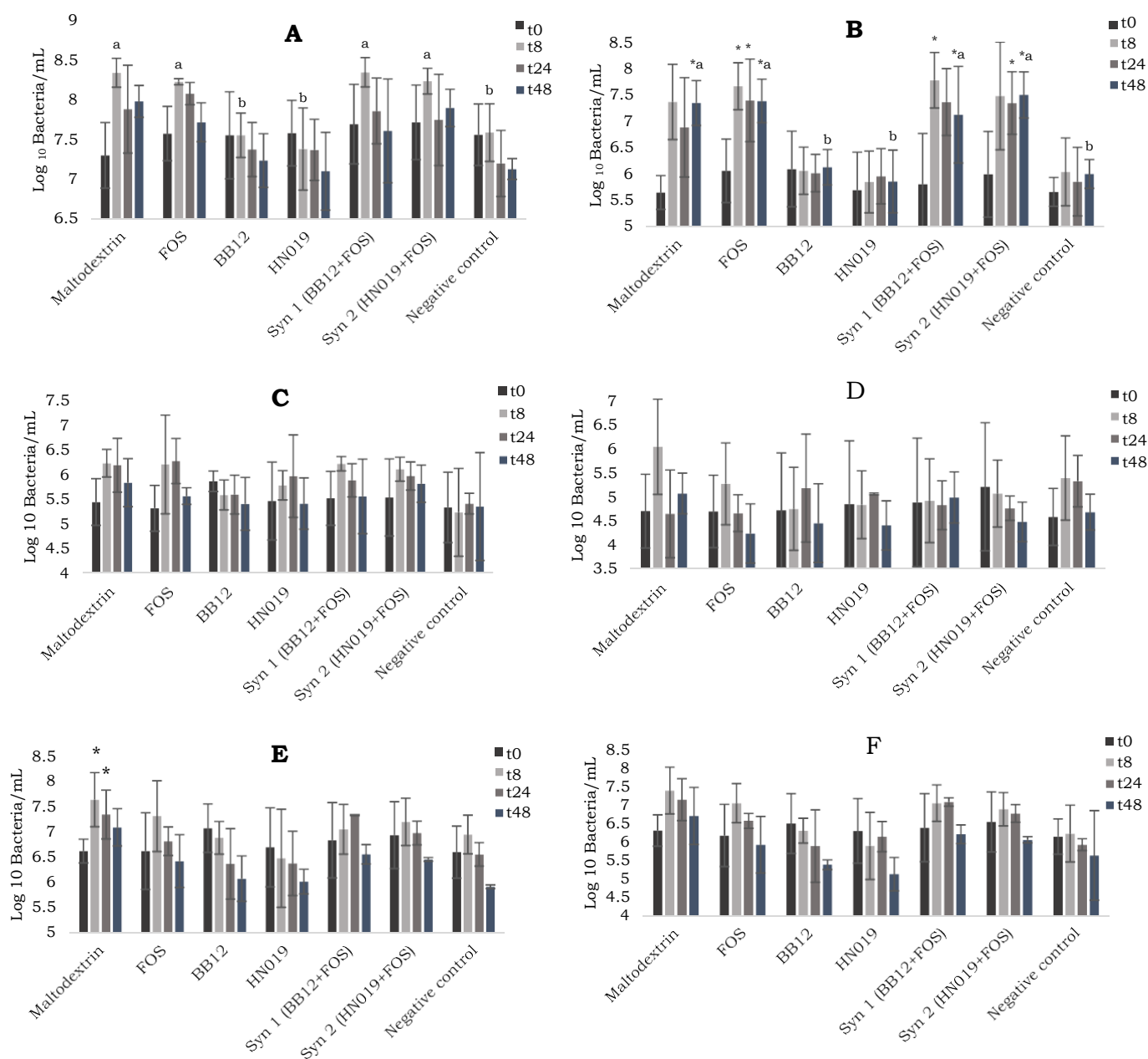
Bacterial counts in control and treatment groups are shown in Figs. 1 and 2. Increases in total bacterial levels (Fig. 1A) were observed after 8 h for maltodextrin, FOS and both

synbiotic mixtures compared to probiotics ( $P < 0.05$ ). The highest number of bacteria was detected in the fermentation with Bb12 + FOS (Syn 1) at 8 h ( $\text{Log}_{10} 8.34 \pm 0.18$  bacteria  $\text{mL}^{-1}$ ).

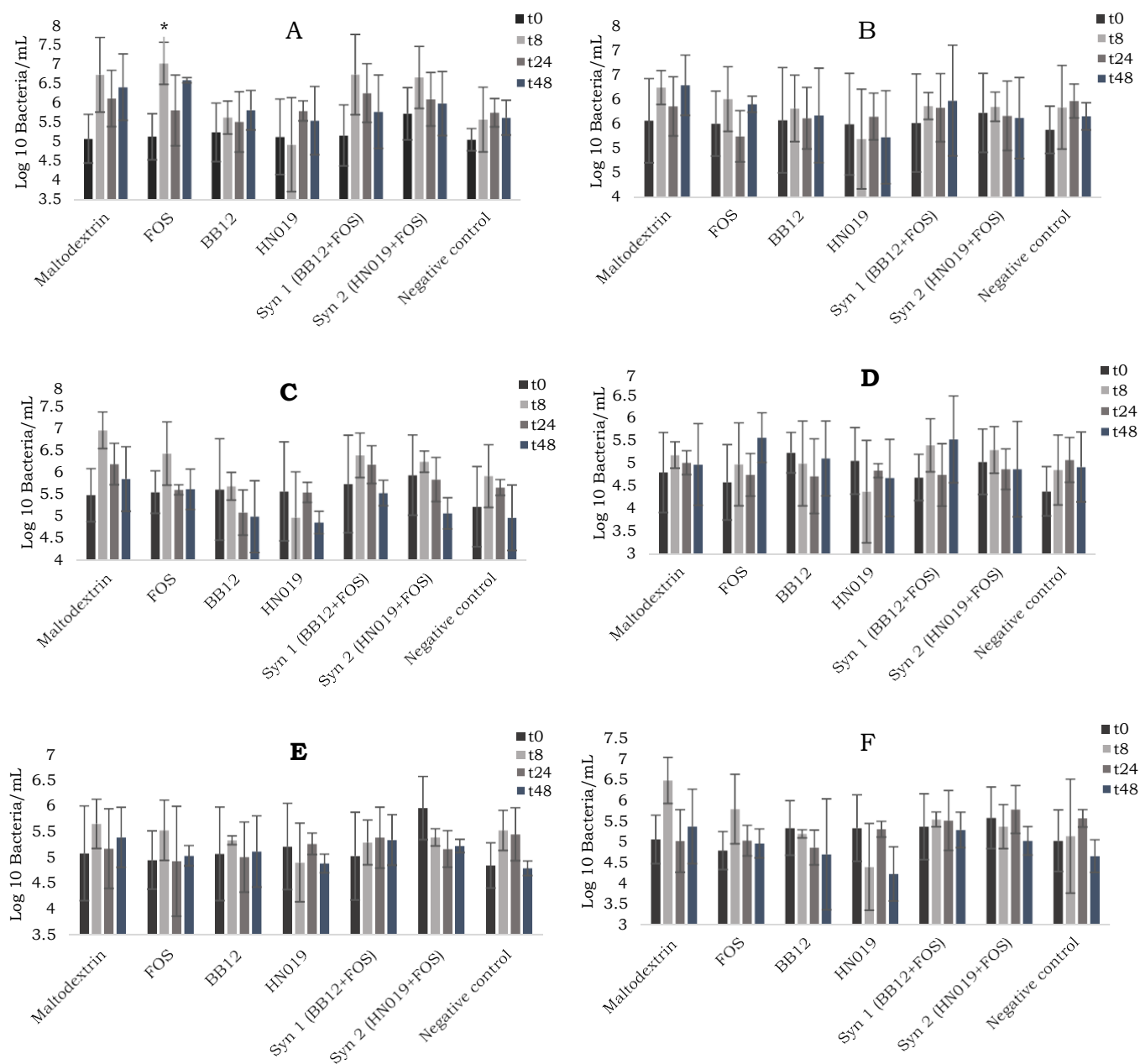
A significant increase in *Bifidobacterium* spp. numbers (Fig. 1B) was observed for maltodextrin, FOS and synbiotic mixtures compared to probiotics and the negative control ( $P < 0.041$ ). Regarding *Lactobacillus-Enterococcus* group (Fig. 1C), a rise was observed, but the increase was not significant at all time points ( $P > 0.10$ ), the highest number was detected in the FOS cultures at 24 h.

Levels of *Clostridium coccooides-Eubacterium rectale* group (Fig. 1E) significantly increased at 8 and 24 h of fermentation with maltodextrin ( $P = 0.028$  and  $P = 0.038$ , respectively) ( $\text{Log}_{10} 6.61 \pm 0.23$  to  $7.63 \pm 0.53$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ ). An increase in *Atopobium* cluster (Fig. 2A) was observed with FOS fermentation at 8 h ( $\text{Log}_{10} 5.12 \pm 0.59$  to  $7.02 \pm 0.54$  bacteria  $\text{mL}^{-1}$ ) ( $P = 0.034$ ). Because of high variations among the volunteers at 8 and 24 h, the increase in *Atopobium* cluster was not significant for maltodextrin and synbiotic mixtures compared to baseline.

No significant differences were found for the other bacterial groups analysed, including *Bacteroides* spp.-*Prevotella* group, *Roseburia* genus, Clostridial cluster IX populations, *F. prausnitzii* group, *Desulfovibrio* genus, *Clostridium histolyticum* group and *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*.



**Fig. 1.** Total bacterial (A), Bif164 (B), Lab158 (C), Bac303 (D), Erec482 (E) and Rrec584 (F) changes over time as log<sub>10</sub> CFU/mL in anaerobic batch culture as analysed by Fluorescence in situ hybridization (FISH). Values are mean  $\pm$  standard deviation at four time points from batch cultures of faeces from three healthy donors. \*Mean values were significantly different from baseline ( $P < 0.05$ ) within the same treatment. Different letters in the same time of different treatments are shown when significantly different ( $P < 0.05$ ) by Tukey's test.



**Fig. 2.** Ato291 (A), Prop853 (B), Fprau655 (C), DSV687 (D), Chis150 (E) and CFB286 (F) changes over time as log<sub>10</sub> CFU/mL in anaerobic batch culture as analysed by Fluorescence in situ hybridization (FISH). Values are mean values  $\pm$  standard deviation at four time points from batch cultures of faeces from three healthy donors. \*Mean values were significantly different from baseline ( $P < 0.05$ ) within the same treatment. Different letters in the same time of different treatments are shown when significantly different ( $P < 0.05$ ) by Tukey's test.

### 3.3.2 SCFA Production

Following administration of all treatments, acetate was the main end product of microbial fermentation (Table 2). Acetate concentrations were highest ( $P < 0.05$ ) with maltodextrin, FOS and synbiotic vessels at all time points (8, 24 and 48 h) compared to the negative control and probiotics; however, there were no significant differences among these three treatments (maltodextrin, FOS and synbiotics).

Supplementation with maltodextrin had the largest effect in increasing the concentration of butyrate at 8 h, which was significantly ( $P < 0.011$ ) higher than the negative control and other treatments. After 24 h of fermentation, the concentration of butyrate was also higher ( $P < 0.05$ ) in vessels with FOS and synbiotic addition compared to the negative control.

Propionate was increased in all vessels compared to baseline ( $P < 0.05$ ); however, because of high variations among volunteers, increase of this SCFA in all treatments was not significant compared to the negative control ( $P > 0.05$ ).

On the other hand, isovalerate, a branched-chain fatty acid (BCFA) product of amino acid metabolism was higher ( $P < 0.05$ ) in the probiotic vessels and the negative control after 24 and 48 h of fermentation. Finally, to a lesser extent, valerate and isobutyrate concentrations were higher after all treatments compared to baseline ( $P < 0.05$ ), but no statistical difference was found among treatments ( $P > 0.05$ ).

**Table 2.** SCFA concentrations (mM) in pH-controlled batch cultures at 0, 8, 24 and 48 h (n= 3).

	Time point	Mean SCFA concentration (mM) in treatment ( $\pm$ SD):						
		Maltodextrin	FOS	BB12	HN019	BB12+FOS	HN109+FOS	Negative control
<b>Acetate</b>	0 h	4.22 $\pm$ 1.50 <sup>a</sup>	4.12 $\pm$ 1.57 <sup>a</sup>	4.30 $\pm$ 1.63 <sup>a</sup>	4.37 $\pm$ 1.62 <sup>a</sup>	4.21 $\pm$ 1.41 <sup>a</sup>	4.24 $\pm$ 1.36 <sup>a</sup>	4.22 $\pm$ 1.68 <sup>a</sup>
	8 h	61.15 $\pm$ 10.34 <sup>*a</sup>	61.03 $\pm$ 9.55 <sup>*a</sup>	10.94 $\pm$ 0.76 <sup>*b</sup>	8.94 $\pm$ 4.28 <sup>*b</sup>	58.59 $\pm$ 14.48 <sup>*a</sup>	65.84 $\pm$ 9.47 <sup>*a</sup>	12.57 $\pm$ 0.74 <sup>*b</sup>
	24 h	68.38 $\pm$ 7.11 <sup>*a</sup>	66.75 $\pm$ 14.33 <sup>*a</sup>	15.30 $\pm$ 0.07 <sup>*b</sup>	14.90 $\pm$ 2.89 <sup>*b</sup>	70.75 $\pm$ 4.42 <sup>*a</sup>	71.39 $\pm$ 2.58 <sup>*a</sup>	16.30 $\pm$ 0.84 <sup>*b</sup>
	48 h	69.60 $\pm$ 10.01 <sup>*a</sup>	77.34 $\pm$ 9.14 <sup>*a</sup>	15.64 $\pm$ 0.75 <sup>*b</sup>	15.38 $\pm$ 0.76 <sup>*b</sup>	72.16 $\pm$ 3.52 <sup>*a</sup>	70.38 $\pm$ 2.05 <sup>*a</sup>	16.81 $\pm$ 1.54 <sup>*b</sup>
<b>Propionate</b>	0 h	0.23 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.20 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.24 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.22 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
	8 h	8.29 $\pm$ 3.88 <sup>a</sup>	6.52 $\pm$ 4.85 <sup>a</sup>	2.21 $\pm$ 0.26 <sup>*a</sup>	1.61 $\pm$ 1.06 <sup>a</sup>	5.95 $\pm$ 1.84 <sup>*a</sup>	5.52 $\pm$ 2.08 <sup>*a</sup>	2.45 $\pm$ 0.07 <sup>*a</sup>
	24 h	17.40 $\pm$ 8.29 <sup>*a</sup>	15.07 $\pm$ 8.81 <sup>a</sup>	3.44 $\pm$ 0.63 <sup>*a</sup>	3.15 $\pm$ 0.17 <sup>*a</sup>	17.96 $\pm$ 7.31 <sup>*a</sup>	15.07 $\pm$ 7.55 <sup>a</sup>	4.03 $\pm$ 0.28 <sup>*a</sup>
	48 h	17.58 $\pm$ 8.35 <sup>*a</sup>	18.55 $\pm$ 9.54 <sup>*a</sup>	3.54 $\pm$ 0.41 <sup>*a</sup>	3.27 $\pm$ 0.37 <sup>*a</sup>	16.15 $\pm$ 6.44 <sup>*a</sup>	17.41 $\pm$ 9.11 <sup>a</sup>	4.20 $\pm$ 0.64 <sup>*a</sup>
<b>Butyrate</b>	0 h	0.02 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0.02 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0.02 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0.02 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0.02 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0.02 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0.02 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
	8 h	1.58 $\pm$ 0.60 <sup>*a</sup>	0.68 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup>	0.27 $\pm$ 0.10 <sup>*b</sup>	0.24 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	0.77 $\pm$ 0.19 <sup>*b</sup>	0.66 $\pm$ 0.21 <sup>*b</sup>	0.36 $\pm$ 0.07 <sup>*b</sup>
	24 h	2.56 $\pm$ 0.16 <sup>*a</sup>	1.93 $\pm$ 0.13 <sup>*a</sup>	0.54 $\pm$ 0.07 <sup>*b</sup>	0.46 $\pm$ 0.16 <sup>*b</sup>	2.49 $\pm$ 0.55 <sup>*a</sup>	2.56 $\pm$ 1.03 <sup>a</sup>	0.56 $\pm$ 0.09 <sup>*b</sup>
	48 h	2.68 $\pm$ 0.05 <sup>*a</sup>	2.47 $\pm$ 0.28 <sup>*a</sup>	0.59 $\pm$ 0.12 <sup>*b</sup>	0.52 $\pm$ 0.14 <sup>*b</sup>	2.55 $\pm$ 0.50 <sup>*a</sup>	2.79 $\pm$ 0.73 <sup>*a</sup>	0.60 $\pm$ 0.09 <sup>*b</sup>
<b>Lactate</b>	0 h	0.01 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
	8 h	0.45 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	1.05 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.72 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	1.02 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
	24 h	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
	48 h	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
<b>Isobutyrate</b>	0 h	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0.02 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
	8 h	0.12 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.07 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.07 $\pm$ 0.02 <sup>*a</sup>	0.08 $\pm$ 0.01 <sup>*a</sup>	0.07 $\pm$ 0.03 <sup>*a</sup>	0.07 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.10 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
	24 h	0.55 $\pm$ 0.13 <sup>*a</sup>	0.39 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	0.45 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	0.59 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	0.59 $\pm$ 0.21 <sup>*a</sup>	0.55 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	0.74 $\pm$ 0.27 <sup>*a</sup>
	48 h	0.68 $\pm$ 0.08 <sup>*a</sup>	0.65 $\pm$ 0.25 <sup>*a</sup>	0.51 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	0.79 $\pm$ 0.25 <sup>*a</sup>	0.71 $\pm$ 0.20 <sup>*a</sup>	0.67 $\pm$ 0.25 <sup>*a</sup>	0.82 $\pm$ 0.25 <sup>*a</sup>
<b>Isovalerate</b>	0 h	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
	8 h	0.01 $\pm$ 0 <sup>*a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0 <sup>*a</sup>	0.01 $\pm$ 0 <sup>*a</sup>	0.01 $\pm$ 0 <sup>*a</sup>	0.01 $\pm$ 0 <sup>*a</sup>	0.02 $\pm$ 0 <sup>*a</sup>
	24 h	0.04 $\pm$ 0.01 <sup>*b</sup>	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.10 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.08 $\pm$ 0.03 <sup>*a</sup>	0.04 $\pm$ 0.01 <sup>*b</sup>	0.04 $\pm$ 0 <sup>*b</sup>	0.16 $\pm$ 0.04 <sup>*a</sup>
	48 h	0.07 $\pm$ 0.01 <sup>*b</sup>	0.05 $\pm$ 0.02 <sup>*b</sup>	0.12 $\pm$ 0.05 <sup>*a</sup>	0.11 $\pm$ 0.05 <sup>*a</sup>	0.06 $\pm$ 0.01 <sup>*b</sup>	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>*b</sup>	0.17 $\pm$ 0.03 <sup>*a</sup>
<b>Valerate</b>	0 h	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
	8 h	0.09 $\pm$ 0.09 <sup>*a</sup>	0.07 $\pm$ 0.11 <sup>*a</sup>	0.09 $\pm$ 0.12 <sup>*a</sup>	0.02 $\pm$ 0.03 <sup>*a</sup>	0.08 $\pm$ 0.10 <sup>*a</sup>	0.07 $\pm$ 0.08 <sup>*a</sup>	0.13 $\pm$ 0.11 <sup>*a</sup>
	24 h	0.26 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.18 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	0.20 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	0.29 $\pm$ 0.11 <sup>*a</sup>	0.27 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.34 $\pm$ 0.04 <sup>*a</sup>
	48 h	0.34 $\pm$ 0.04 <sup>*a</sup>	0.29 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.27 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	0.35 $\pm$ 0.07 <sup>*a</sup>	0.33 $\pm$ 0.09 <sup>*a</sup>	0.36 $\pm$ 0 <sup>*a</sup>

\*Mean values were significantly different from baseline ( $p < 0.05$ ) within the same treatment. Different letters in the same line (same time) are significantly different ( $P < 0.05$ ) by Tukey's test.

### 3.4 DISCUSSION

The results of our study show that faecal bacteria responded differently between carbohydrate-containing vessels and probiotics alone in pH controlled stirred batch cultures. Although *B. lactis* fermentation had no significant effect upon relevant microbial populations at the genus level, we can speculate that an interplay among other strains possibly occurred. This outcome (no substantial differences in genus level) is plausible due to the highly competitive environment and/or the numbers of probiotic added being too low to have a discernible effect.

In contrast, significant changes in bifidobacterial numbers were observed in response to FOS, maltodextrin and synbiotic mixtures. Bifidobacteria are recognised as one of the most important bacterial groups associated with human health, providing beneficial effects in the large intestine (Russel, Rossa, Fitzgerald, & Stanton, 2011). It is well known that an increase in bifidobacterial numbers is favoured by the presence of (mainly) fermentable carbohydrates. In this sense, supplementation with maltodextrin also surprisingly increased the growth of bifidobacteria, similar to FOS. Whereas FOS (along with GOS) is the dietary prebiotic most extensively documented to have health benefits in humans, maltodextrin is a maltooligosaccharide not usually considered to be a prebiotic. FOS is preferentially metabolized by bifidobacteria, since its linkage bonds can be readily degraded by  $\beta$ -fructanosidase enzyme (prevalent in bifidobacteria) (Gibson, 2017). We postulate that enhanced growth of bifidobacteria in the presence of maltodextrin was probably due to the ability of some bifidobacterial species to produce the enzyme that hydrolyses maltodextrin to glucose for growth (Yeo & Liong, 2010), confirming the bifidogenic activity of maltodextrin *in vitro*. However, it is important to emphasize that maltodextrin is a common placebo for prebiotic research in humans (Kolida & Gibson, 2007; Costabile et al., 2010; Ramnani et al., 2015; Pederson et al., 2016). Since maltodextrins are partially depolymerized starch granules,

digestion of maltodextrin occurs through the same human starch digesting enzymes ( $\alpha$ -amylase and maltase). The glucose and maltose obtained from maltodextrin digestion is readily absorbed in the small intestine and subsequently used in metabolism (Hofman, Buul, & Brouns, 2016), and therefore, no substrate reaches the colon to be fermented by the intestinal bacteria such as bifidobacteria.

Lactate and acetate produced by bifidobacteria may cross-feed butyrate-producing colon bacteria such as *Eubacterium rectale* (Moens, Verce, & Vuyst, 2017). In this respect, numbers of *Clostridium coccooides*-*Eubacterium rectale* group were increased in the maltodextrin vessel, possibly due to such cross-feeding. *E. rectale* is recognized as one of the most prolific butyrate producers in the human colon. Coinciding with the increase in *E. rectale* numbers, the highest concentration of butyrate after 8 h was found in the vessel with maltodextrin. FOS and synbiotic mixture fermentations also increased butyrate concentrations after 24 and 48 h. Butyrate has an important role in metabolism because of its interaction with colonocytes and much has been reported about its benefits in the gut (Canani et al., 2011).

Another cluster stimulated by FOS was *Atopobium*, commonly isolated from healthy human faeces which belongs the *Collinsella* genus (Thorasin, Hoyles, & McCartney, 2015). From the present study, it is not possible to distinguish whether *Atopobium* group can ferment FOS, although it is able to metabolize fructose (Moore, Cato, & Holdeman, 1971) or if the increase is due to cross-feeding among different bacterial groups. An increase in this group has already been reported *in vitro* with FOS (Saulnier, Gibson, & Kolida, 2008); but the role of *Atopobium* in the human colon is still unclear.

In relation to SCFAs, FOS, maltodextrin and synbiotic mixtures induced modulation of the colonic microbiome with increased acetate and butyrate. In the same way as butyrate, acetate production is considered beneficial to the human gut. Acetate is produced mainly through the fructose-6-phosphate phosphoketolase pathway by bifidobacteria (Miller & Wolin,

1996). In this manner, a greater production of this SCFA can be related to the increase of this beneficial group of bacteria in the FOS, maltodextrin and synbiotic vessels.

In contrast to these findings, the presence of maltodextrin and FOS inhibited production of the BCFA isovalerate perhaps due to the increase of carbohydrate availability which reduces the relative protein availability for bacterial fermentation. Since the end products of proteolytic fermentation include toxic metabolites (such as certain phenolic compounds, amines, and ammonia) (Gibson, 2004), this beneficial effect may be mediated by decreased microbial proteolysis. Vitamin B production was also monitored, however, there was no statistical difference among probiotics, FOS, synbiotics and maltodextrin vessels (data not show).

The synbiotics tested in this study did not cause measurable additive or synergistic effects, since they had no superior efficacy to the prebiotic component alone to modulate the faecal microbiota towards a purportedly healthy composition (at the genus level) or in the production of SCFAs. However, that said, it is plausible that there could be strain-specific changes and other health benefits beyond SCFA production that we have not measured. Thus, our study highlights the need for a careful assessment of specific probiotic/prebiotic combinations, dosages and outcome measures used in synbiotic investigations of health and disease-related outcomes.

### **3.5 CONCLUSION**

In the current study, maltodextrin, FOS and synbiotics led to changes in relevant microbial populations and SCFAs concentrations, compared with the *B. lactis* strains alone. Beneficial modulations were observed in terms of higher levels of bifidobacteria and *Clostridium coccooides-Eubacterium rectale* group combined, with significant increases in acetate and butyrate concentrations. Neither bacterial changes nor SCFA production were

different with the synbiotics compared with the prebiotic alone. These data suggest that metabolic effects of these synbiotics are largely induced by the prebiotic component.

### **3.6 DISCLOSURES/CONFLICTS OF INTEREST**

Materials were provided at no cost by Chr. Hansen Holding A/S, Boege Alle 10-12, 2970 Hoersholm, Denmark. Chr. Hansen had no input into any aspect of study design or into data analysis or reporting of the results. PCC has received consulting fees from Chr. Hansen, but not in relation to this study. None of the other authors has any disclosures.

### **3.7 ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank Chr. Hansen Holding A/S, Boege Alle 10-12, 2970 Hoersholm, Denmark, who provided materials at no cost.

### **3.8 FUNDING**

This work was supported by the National Institute of Health Research through the NIHR Southampton Biomedical Research Centre and by the Parnell Diabetes Trust. Also, this work was supported by a scholarship to F.H.B from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES - Brazil) (process number 88881.131985/2016-01).

### **REFERENCES**

Canani, R. B., Costanzo, M. D., Leone, L., Pedata, M., Meli, R., & Calignano, A. (2011).

Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World Journal of Gastroenterology*, *17*(12), 1519-1528.

Costabile, A., Kolida, S., Klinder, A., Gietl, E., Bäuerlein, M., Froberg, C. et al. (2010). A

double-blind, placebo-controlled, cross-over study to establish the bifidogenic effect of

- a very-long-chain inulin extracted from globe artichoke (*Cynara scolymus*) in healthy human subjects. *British Journal of Nutrition*, *104*, 1007–1017.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K. H., & Wagner, M. (1999). The domain specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology*, *22*, 434–444.
- Daims, H., Stoecker, K., & Wagner, M. (2005). Fluorescence in situ hybridization for the detection of prokaryotes. In Osborn, A. M. & Smith, C. J. (Eds). *Advanced methods in molecular microbial ecology*. pp. 213–239. United Kingdom: BIOS Scientific Publishers.
- Franks, A. H., Harmsen, H. J., Raangs, G. C., Jansen, G. J., Schut, F., & Welling, G. W. (1998). Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*, 3336–3345.
- Gibson, G. R. (2004). Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clinical Nutrition Supplements*, *1*(2), 25-31.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., et al. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *14*, 491-502.
- Guergoletto, K. B., Costabile, A., Flores, G., Garcia, S., & Gibson, G. R. (2016). *In vitro* fermentation of juçara pulp (*Euterpe edulis*) by human colonic microbiota. *Food Chemistry*, *196*, 251-258.
- Hadi, A., Mohammadi, H., Miraghajani, M., & Ghaedi, E. (2018) Efficacy of synbiotic supplementation in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review

- and meta-analysis of clinical trials: Synbiotic supplementation and NAFLD. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 27, 1-12.
- Harmsen, H., Elfferich, P., Schut, F., & Welling, G. (1999). A 16S rRNA-targeted probe for detection of *Lactobacilli* and *Enterococci* in faecal samples by fluorescent in situ hybridization. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 11, 3–12.
- Harmsen, H., Wildeboer-Veloo, A., Grijpstra, J., Knol, J., & Welling, G. W. (2000). Development of 16SrRNA-based probes for the *Coriobacterium* group and the *Atopobium* cluster and their application for enumeration of *Coriobacteriaceae* in human faeces from volunteers of different ages. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4523–4527.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., et al. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11, 506–514.
- Hofman, D. L., Van Buul, V. J., & Brouns, F. J. (2016). Nutrition, health, and regulatory aspects of digestible maltodextrins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(12), 2091-2100.
- Jungersen, M., Wind, A., Johansen, E., Christensen, J. E., Stuer-Lauridsen, B., & Eskesen, D. (2014). The science behind the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12. *Microorganisms*, 2(2), 92-110.
- Kolida, S., Meyer, D., & Gibson, G. R. (2007). A double-blind placebo-controlled study to establish the bifidogenic dose of inulin in healthy humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61(10), 1189-95.

- Krumbeck, J. A., Walter, J., & Hutkins, R. W. (2018). Synbiotics for improved human health: recent developments, challenges, and opportunities. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9, 451-479.
- Langendijk, P.S., Schut, F., Jansen, G.J., Raangs, G.W., Kamphuis, G.R., Wilkinson, M.H., et al. (1995). Quantitative fluorescent in situ hybridisation of *Bifidobacterium* spp. with genus specific 16S rRNA targeted probes and its application in fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3069–3075.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M., & Schleifer, K. H. (1996) Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology*, 142, 1097–1106.
- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9), E1021.
- Meng, H., Lee, Y., Ba, Z., Peng, J., Lin, J., Boyer, A. S., et al. Consumption of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 impacts upper respiratory tract infection and the function of NK and T cells in healthy adults. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(5), 1161–1171.
- Miller, T. L., & Wolin, M. J. (1996). Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5), 1589–1592.
- Moens, F., Verce, M., & De Vuyst, L. (2017) Lactate- and acetate-based cross-feeding interactions between selected strains of lactobacilli, bifidobacteria and colon bacteria in the presence of inulin-type fructans. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 225-236.

- Moore, W. E. C., Cato, E. P., & Holdeman, L. V. (1971). *Eubacterium aerofaciens* (Eggerth) Prevot 1938: Emendation of description and designation of the neotype strain. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 21(4), 307-310.
- O'Sullivan, L. A., Weightman, A. J., & Fry, J. C. (2002) New degenerate Cytophaga–Flexibacter–Bacteroides-specific 16S ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probes reveal high bacterial diversity in River Taff epilithon. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 201–210.
- Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7577–7587.
- Pedersen, C., Gallagher, E., Horton, F., Ellis, R. J., Ijaz, U. Z., Wu, H. et al. (2016). Host-microbiome interactions in human type 2 diabetes following prebiotic fibre (galacto-oligosaccharide) intake. *British Journal of Nutrition*, 116, 1869–1877.
- Ramnani, P., Costabile, A., Bustillo, A. G. R., & Gibson, G. R. (2015). A randomised, double-blind, cross-over study investigating the prebiotic effect of agave fructans in healthy human subjects. *Journal of Nutritional Science*, 4(10), 1-10.
- Ramsing, N. B., Fossing, H., Ferdelman, T. G., Andersen, F. & Thamdrup, B. (1996). Distribution of bacterial populations in a stratified fjord (Mariager fjord, Denmark) quantified by in situ hybridization and related to chemical gradients in the water column. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1391-1404.
- Richardson, A. J., Calder, A. G., Stewart, C. S., & Smith, A. (1989). Simultaneous determination of volatile and non-volatile acidic fermentation products of anaerobes by capillary gas-chromatography. *Letters in Applied Microbiology*, 9(1), 5-8.
- Russel, D. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2011). Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 149(1), 88-105.

- Salazar, N., Dewulf, E. M., Neyrinck, A. M., Bindels, L. B., Cani, P. D., Mahillon J., et al. (2015). Inulin-type fructans modulate intestinal *Bifidobacterium* species populations and decrease fecal short-chain fatty acids in obese women. *Clinical Nutrition*, *34*(3), 501-507.
- Saulnier, D. M., Gibson, G. R., & Kolida S. (2008). *In vitro* effects of selected synbiotics on the human faecal microbiota composition. *FEMS Microbiology Ecology*, *66*(3), 516-527.
- Scorletti, E., Afolabi, P. R., Miles, E .A., Smith D. E., Almeahadi, A., Alshathry, A. et al. (2018) Design and rationale of the INSYTE study: A randomised, placebo controlled study to test the efficacy of a synbiotic on liver fat, disease biomarkers and intestinal microbiota in non-alcoholic fatty liver disease. *Contemporary Clinical Trials*, *71*, 113-123.
- Simpson, H. L. & Campbell, B. J. (2015). Review article: dietary fibre–microbiota interactions. *Alimentary Pharmacology & Therapeutic*, *42*(2), 158–179.
- Suau, A., Rochet, V., Sghir, A., Gramet, G., Brewaeys, S., Sutren, M., et al. (2001). *Fusobacterium prausnitzii* and related species represent a dominant group within the human fecal flora. *Systematic and Applied Microbiology*, *24*, 139-145.
- Thorasin, T., Hoyles, L., & McCartney, A. L. (2015). Dynamics and diversity of the 'Atopobium cluster' in the human faecal microbiota, and phenotypic characterization of 'Atopobium cluster' isolates. *Microbiology*, *161*(3), 565-579.
- Walker, A. W., Duncan, S. H., McWilliam Leitch, E. C., Child, M. W., & Flint, H. J. (2005). PH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acids ratios within microbial communities from the human colon. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*, 3692–3700.

- Wallner, G., Amann, R., & Beisker, W. (1993). Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*, *14*, 136-43.
- Wang, X., Gibson, G. R., Costabile, A., Sailer, M., Theis, S., & Rastall, R. A. (2019). Prebiotic supplementation of *in vitro* faecal fermentations inhibits proteolysis by gut bacteria and host diet shapes gut bacterial metabolism and response to intervention. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM. 02749-18.
- Yeo, S. K., & Liong, M. T. (2010). Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(2), 267-275.

## **CAPÍTULO 4 – METABONOMIC ASSESSMENT OF *Bifidobacterium lactis* HN019 EFFECTS IN OVERWEIGHT WOMEN**

Fernanda C. Henrique-Bana,<sup>\*a</sup> Fernando Macedo Jr.,<sup>b</sup> Liliane G. S. Oliveira,<sup>c</sup> Lucia Helena S. Miglioranza,<sup>a</sup> Wilma A. Spinosa<sup>a</sup> and Giselle N. Costa<sup>c</sup>

### **Affiliations:**

<sup>a</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 86057-970, Brazil.

<sup>b</sup>Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 86057-970, Brazil.

<sup>c</sup>Mestrado Acadêmico em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Universidade Pitágoras Unopar, Londrina, PR, 86041-100, Brazil.

**\*Corresponding author:** Fernanda C. Henrique-Bana

E-mail address: ferchenrique@gmail.com

### **ABSTRACT**

Probiotics can influence the metabolites distribution in human biofluids, tissues and organs, but little is known about *Bifidobacterium* effects on metabonomic fingerprinting of human plasma. In order to evaluate the effect of milk containing *B. lactis* HN019 administration on human metabolism, a randomized, double-blind, placebo-controlled study was conducted on 60 overweight women enrolled into two groups. Over 60 days, the probiotic group (n=30) consumed a milk containing  $9.6 \times 10^{10}$  colony forming units (CFU)/dose (80 mL) of HN019 strain, whereas the placebo group (n=30) consumed a sterilized milk without the probiotics.

Blood plasma samples were collected at the baseline (day 0) and at the end of the study (day 60). To investigate metabolic alterations, we performed plasma metabonomics analysis using high resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$  NMR) spectroscopy coupled with multivariate statistical analysis. Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) showed different metabolic plasma profiles after both probiotic milk and placebo milk consumption ( $p < 0.01$ ) compared to baseline. Consequently, the present study indicated an effect of the delivering vehicle on the plasma metabolite profile, which was independent of a concomitant consumption of probiotics. So far, the application of  $^1\text{H}$  NMR-based metabonomics enabled the identification of the overall effects of milk consumption among overweight women and could be useful to understand how metabolic balance was disturbed by the ingestion of the probiotic and sterilized milk.

#### 4.1 INTRODUCTION

An important role in the maintenance of health and well-being is ascribed to the functionality of the many microorganisms living in the gastrointestinal tract (GIT) and their interactions with the host system. In these mutual exchanges, different microorganisms, known as intestinal microbiota, produce a diverse metabolites repertoire from the anaerobic fermentation of undigested dietary components that reach the colon, as well as from endogenous compounds that are generated by the microorganisms themselves and their hosts.<sup>1</sup>

Among numerous dietary components that strongly influence the composition of the microbiota and its metabolites, the metabolic modulation have been assigned mainly to probiotics, defined as “live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host”. In fact, accumulating evidence suggests that probiotics may interact with the human intestinal microbiota to induce positive changes in its composition and activities.<sup>2-5</sup> However, this interaction is not fully understood due to the complex composition

of the intestinal microbiota in each individual. In addition, intestinal microorganisms differ markedly between individuals, and the metabolite profiles that they produce can be highly variable.<sup>6</sup>

For this reason, several approaches have been used to reveal the interactions between probiotics and the intestinal microbiota, including genomics, transcriptomics, proteomics, and most recently, metabonomics. In particular, metabonomics is a powerful biological tool that can provide the end point of consequences of nutritional intervention, which can help us understand how metabolic balances are disturbed by interventions.<sup>7</sup>

Metabonomics based on high field proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (<sup>1</sup>HNMR) coupled with multivariate data analysis has already proven to be a robust technique for identify metabolic responses to dietary interventions.<sup>8-9</sup> With a minimum of sample preparation, high reproducibility, and short experimental time, it can be considered a superior approach for detection of metabolite changes associated with probiotics, for instance.<sup>10</sup>

Although the literature describes the relevance of the theme,<sup>6</sup> human metabolic fingerprinting approaches related to the effects of probiotic administration have been few reported.<sup>11-16</sup> In addition, it is important to emphasize that some of the effects of probiotics, at the intestinal and extraintestinal level, are more likely to be strain-specific<sup>2</sup>, in this way, the impact of probiotics on human metabolites should be evaluated in a comprehensive manner, but unique in relation to the effect of each strain.

*Bifidobacterium lactis* HN019 is a commercial probiotic strain with several beneficial effects to humans, as reported by multiple studies,<sup>17-20</sup> including our previous studies which described a decrease in obesity, blood lipids, and inflammatory or oxidative stress markers in patients with and without metabolic syndrome (MetS).<sup>21,22</sup> These results instigated us to analyze the impact of supplementation with HN019 strain on metabolic intermediates.

Kim *et al*<sup>16</sup> have reported the metabolite modulation by species of lactobacilli in overweight individuals, however, we are not aware of any metabonomic report on the effects of *Bifidobacterium* species in this condition or in obesity. Therefore, in this study, we aimed to determine whether the consumption of a fermented milk product containing  $9.6 \times 10^{10}$  colony forming units (CFU)/dose of *B. lactis* HN019 or sterilized milk (placebo) resulted in changes in plasma metabolite profiles of overweight women, by means of <sup>1</sup>H NMR-based metabonomics.

## 4.2 MATERIALS AND METHODS

### 4.2.1 Production of Probiotic Milk

Milk was prepared by adding 10% (w/v) of skim milk powder (Confepar, Londrina, PR, Brazil) to water and then thermally treated at 121°C for 15 min, followed by cooling to 37°C in an ice bath. The freeze-dried culture *Bifidobacterium lactis* HN019 (HOWARU® Bifido) from DuPont™ Danisco A/S (Copenhagen, Denmark) was then added through Direct Vat Inoculation (DVI), with mass percentage of 0.1% w/v, and incubated at 37°C until counting at  $9.00 \log$  CFU/mL for 14 hours. At the end of fermentation, the resulting product was refrigerated at 5°C. The clot was broken by agitation and finally were added 0.01% (w/v) of stevia sweetener (Linea, Anápolis, Brazil) and 0.05% (v/v) of vanilla aroma (Duas Rodas Industrial, Jaraguá do Sul, Brazil). A sterilized milk was produced in the same manner as just described, but without the probiotic bacteria. Both milk products were aseptically packaged into 80 mL sterile bottles (Inplavel, Joinvile, Brazil) and stored under refrigeration (4°C). In this study, the two products will be referred to as the probiotic milk and the placebo milk.

The viable cell counts of the probiotic strain HN019 (CFU/mL) were determined on De Man Rogosa Sharpe (MRS) agar enriched with L-cysteine as the reducing agent as previously described<sup>23</sup> with modifications; specifically, the concentration of L-cysteine was increased to

0.3%. The Petri dishes were incubated for 72 h at 37°C under anaerobiosis (Anaerobac of Probac®).

#### 4.2.2 Selection of Study Group

The study was conducted according to the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethical Committee on Human Research of the Universidade Norte do Paraná, PR, Brazil (process number 67602217.1.0000.0108) (ANEXO II). The volunteers were then selected through a public invitation made by community health agents of the Basic Health Unit named Raul Castilho, in the city of Apucarana, PR, Brazil.

Inclusion criteria were being aged between 18 and 60 years and being overweight<sup>24</sup>, ie having a Body Mass Index (BMI) between 25.0 and 29.9 kg/m<sup>2</sup>. Exclusion criteria included the presence of diabetes, thyroid, renal, hepatic, gastrointestinal, infectious or oncological diseases; pregnancy; permanent use of hormone replacement therapy, vitamins, antioxidant supplements, antibiotics, probiotics, prebiotics and anti-inflammatories; and known lactose intolerant or allergy to milk components.

#### 4.2.3 Study Design and Sample Collection

The volunteers meeting inclusion criteria signed the consent form about the purpose and procedures of the study. They were instructed not to ingest any food or supplement containing probiotic microorganisms and not to change their eating habits and/or activity level or other lifestyle factors during the intervention period.

Sixty-five volunteers were enrolled in the study and randomized into “probiotics” (n=33) and “placebo” (n=32) groups using a double-blind, randomized, and placebo-controlled design. During the intervention period, five subjects dropped out for reasons unrelated to the

study and, consequently, a group of 60 women with an average age of 40 years reached the end of the intervention.

For 60 days, women in the probiotics group daily-ingested during breakfast 80 mL of a probiotic milk containing an average of  $1.2 \times 10^9$  colony forming units (CFU)/mL of *B. lactis* HN019. For the same period, the placebo group received 80 mL of the milk without probiotic.

Plasma samples from all the women were collected at the beginning (day 0, baseline) and at the end of the study (day 60). Tubes for plasma collections contained EDTA, as anticoagulant. Plasma samples were centrifuged at 1,600 g for 10 min and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until NMR analysis.

#### 4.2.4 $^1\text{H}$ NMR Spectroscopy of Plasma Samples

The frozen plasma samples were thawed, vortexed and centrifuged at 12,000 g for 5 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Aliquots of 200  $\mu\text{L}$  supernatant were transferred into 5 mm NMR tubes (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Mo., USA), and mixed with 400  $\mu\text{L}$  of normal saline (0.9% w/v in 80% deionized water and 20%  $\text{D}_2\text{O}$ ).  $\text{D}_2\text{O}$  was used for field frequency locking and normal saline was used to maintain normal plasma osmolarity.<sup>25</sup>

NMR experiments were performed using a 400.13 MHz Bruker spectrometer (Mod. Avance III, Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany) equipped with a 5mm multinuclear Broaband Probe (BBO). A water-presaturation Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence (recycle delay- $90^{\circ}$ -( $\tau$ - $180^{\circ}$ - $\tau$ )<sub>n</sub>-acquisition) was employed to suppress the highly intense signal of the water and to attenuate the NMR signals from macromolecules, in order to generate a spectrum with signals from low molecular weight metabolites. All spectra were acquired at 298 K using the same parameters: 128 scans of 32k data points, 16 dummy scans, spectral width of 20 ppm, spin-echo delay of 400  $\mu\text{s}$ , relaxation delay of 2 s, acquisition time of 4.09 sec, requiring 15 min and 24 s per sample.

#### 4.2.5 NMR Data Processing and Multivariate Statistical Analysis

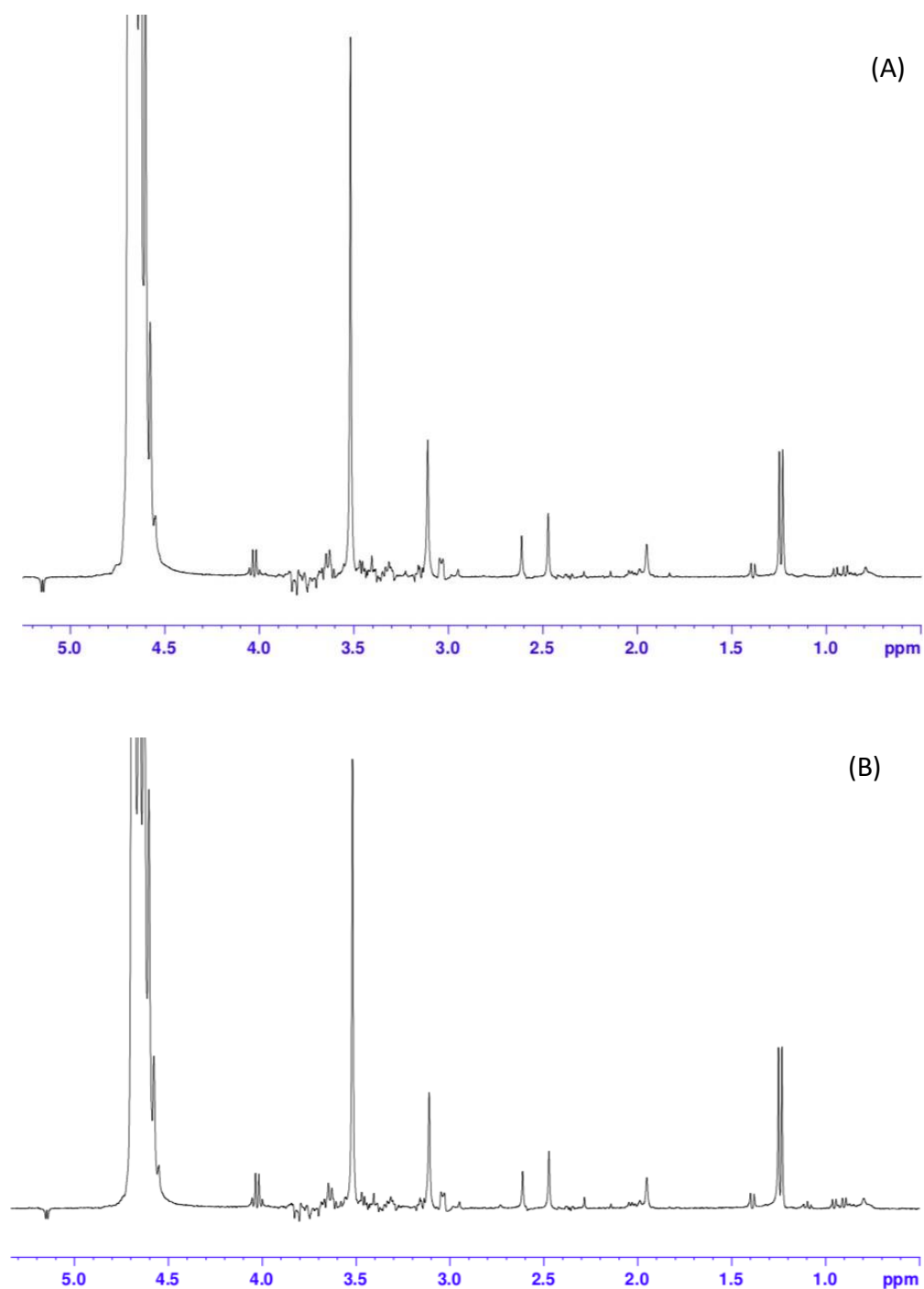
All NMR spectra were manually phased and baseline-corrected using TopSpin software version 3.5.7 (Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany) and converted to CSV file format (spectra region ranging from 5.2-0.5 ppm). The resulting data set from  $^1\text{H}$  CPMG NMR experiments were then imported into the web-based metabolomic data processing tool MetaboAnalyst<sup>26</sup>, for multivariate statistical analysis. This web application carries out the statistical computing and visualization operations using functions from R packages.

The data were scaled using Pareto scaling (in which each variable is weighted by the square root of its standard deviation),<sup>27,28</sup> interquartile range (IQR) filtered and row-size normalized by the sum of the intensities to reduce systematic bias during sample collection.<sup>29</sup> Principal component analysis (PCA) was used for initial synopsis of the grouping trend within the data set and outlier detection. Next, the data was modeled with the supervised method of orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) to reveal possible class separations between the groups. OPLS-DA is a data visualization method that is useful for observing grouping within multivariate data, since it is able to rotate the projection so that the model focuses on the effect of interest. This supervised analysis uses linear regression, where the class memberships of samples are included in the calculation.<sup>30</sup>

However, the resultant models from OPLS-DA need validation to check whether the separation is statistically significant or is due to random noise as OPLS-DA tend to overfit the data. The validity of the OPLS-DA model is usually assessed by the following statistical parameters: the correlation coefficient  $R^2Y$  and the cross-validation correlation coefficient  $Q^2Y$ . In this way, the OPLS-DA models were cross-validated by a permutation analysis (100 times), and the resulting parameters were used to assess the quality of the models, i.e., the goodness-of-fit parameter by  $R^2Y$  and the goodness of prediction parameter by  $Q^2Y$ .<sup>30</sup>

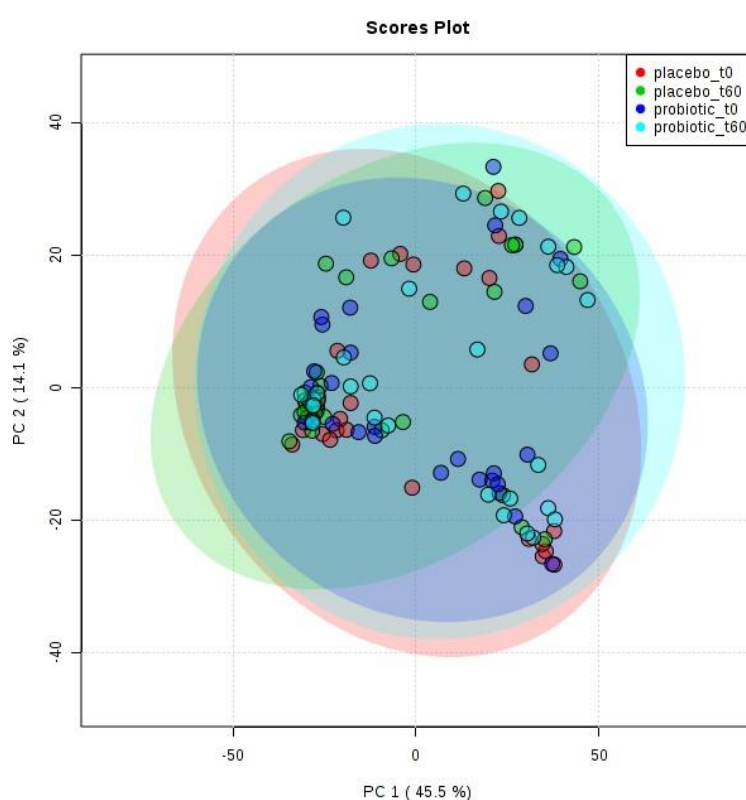
### 4.3 RESULTS AND DISCUSSION

The representative  $^1\text{H}$  CPMG NMR spectra of plasma samples, from a randomly selected woman, at baseline and after 60 days of consumption of the probiotic milk are shown, respectively in Fig.1.



**Fig. 1.** Representative 400 MHz  $^1\text{H}$ -NMR spectra obtained from woman plasma at baseline (A) and after 60 days of consumption (B) of the probiotic milk.

The analysis of the profile changes of the endogenous metabolites allows a “fingerprint” of a particular intervention focusing on qualitative evaluation and not so much in the quantification of a metabolite.<sup>6</sup> For this reason, to get the overall metabolic trends and identify the outliers in the plasma metabolomes, the exploratory analysis (PCA) was performed on both probiotic and placebo groups at the baseline and day 60 post treatment (Fig. 2). No separation of the spectra was observed in any of the cases and no outlier was detected.



**Fig. 2.** Principal component analysis (PCA) score plot derived from the  $^1\text{H}$  NMR spectra data of overweight women belonging to the placebo ( $n=30$ ) and probiotic groups ( $n=30$ ) at baseline ( $t_0$ ) and 60 days post treatment ( $t_{60}$ ).

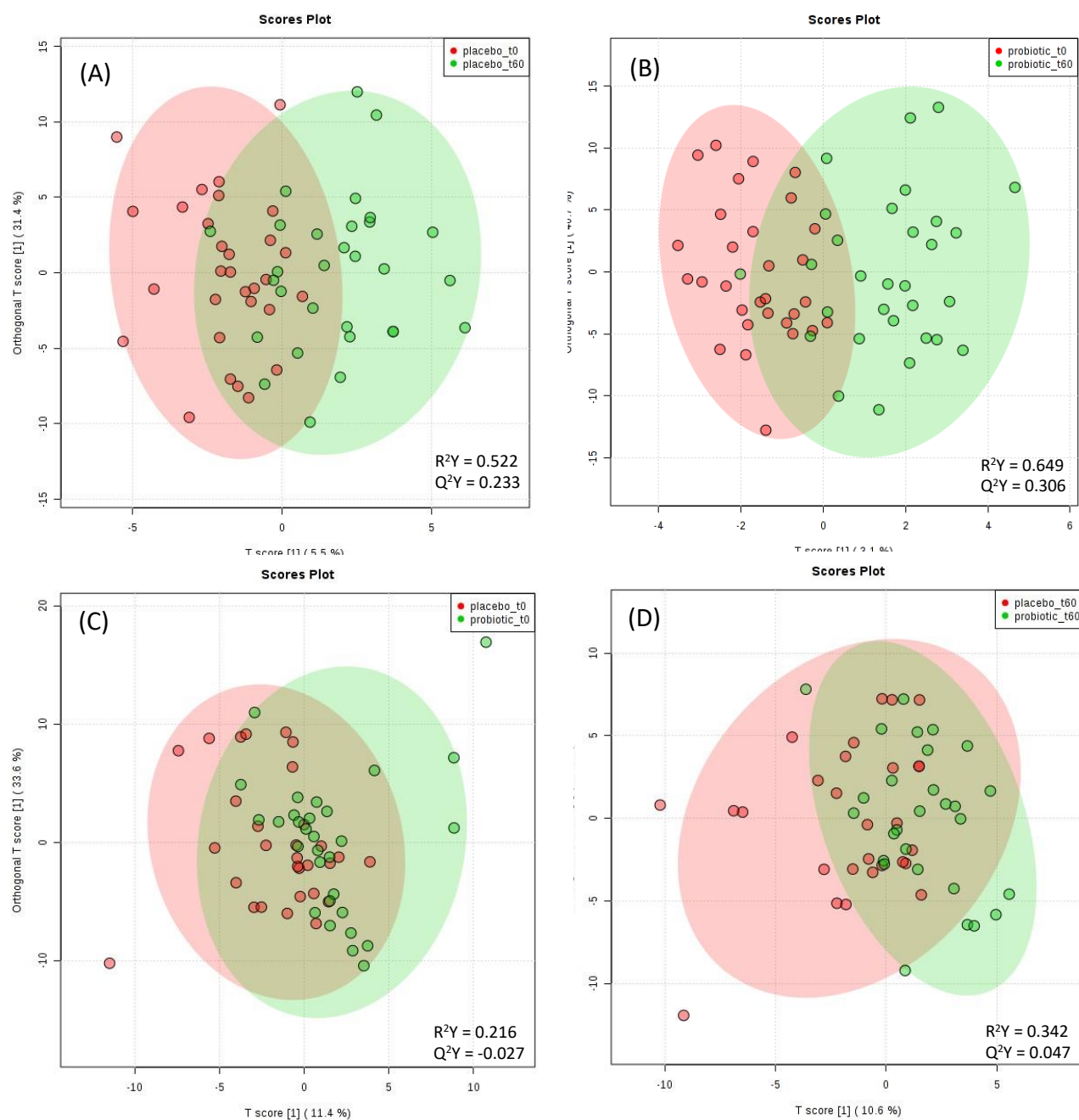
Therefore, to further identify the significantly changes between the groups and timepoints, pairwise comparative OPLS-DA analyses were performed. Studies have been reported and validated the ability of OPLS-DA to maximize the independence of the variables,

resulting in better separation of data between cohorts and this way in better discrimination of individual metabolic profiles.<sup>31-32</sup> In fact, OPLS-DA is the most appropriate technique to search for metabolic profiles that define the characteristics of the probiotic-induced changes because the predictive component describes the treatment effect excluding the variance among samples in the same group.<sup>16</sup>

OPLS-DAs were then conducted for the following four combinations of groups: (1) the comparison between the baseline levels and the 60 days follow-up levels of the placebo group (n = 30) (Fig. 3A); (2) the comparison between the baseline levels and the 60 days follow-up levels of the probiotic group (n = 30) (Fig. 3B); (3) the comparison between the 60 days follow-up levels of the placebo group (n = 30) and the probiotic group (n = 30) (Fig. 3C); and (4) the comparison between the baseline levels of the placebo group (n = 30) and the probiotic group (n = 30) (Fig. 3D).

Our analyses revealed that the placebo and probiotic models (Fig. 3A and B) displayed greater than 52% goodness-of-fit ( $R^2Y = 0.522$  ( $p < 0.01$ ) and  $R^2Y = 0.649$  ( $p < 0.01$ )) for the placebo and probiotic groups, respectively) and a maximum predictive ability of 30% ( $Q^2Y = 0.233$  ( $p < 0.01$ ) and  $Q^2Y = 0.306$  ( $p < 0.01$ )) for the placebo and probiotic groups, respectively). Thus, although these OPLS-DA models did not displayed an acceptable predictive ability ( $Q^2Y$  lower than 0.5), they showed a discriminatory potential and are significant, having a p-value  $< 0.01$ .

Additionally, the two-component OPLS-DA scatter plots of the plasma metabolites for the third and fourth combination of groups (Fig. 3C and D) did not show distinct clustering or any separation of participants in the placebo group and probiotic at baseline ( $R^2Y = 0.216$  ( $p = 0.21$ ) and  $Q^2Y = -0.027$  ( $p = 0.19$ )) and after 60 days follow-up assessment ( $R^2Y = 0.342$  ( $p = 0.12$ ),  $Q^2Y = 0.047$  ( $p = 0.02$ )). These data demonstrated that these OPLS-DA models were not significant, showing no predictive ability or discriminatory potential.



**Fig. 3.** Plasma metabolomics profile of overweight women before and after the consumption of a placebo milk and/or a probiotic milk. (A) Score plots from OPLS-DA models in the placebo group (n = 30); comparison between baseline (t0, red) and 60 days follow-up (t60, green) levels in the placebo group. (B) Score plots from OPLS-DA models in the probiotic group (n = 30); comparison between baseline (t0, red) and 60 days follow-up (t60, green) levels in the probiotic group. (C) Score plots from OPLS-DA models at the baseline (t0); comparison between baseline in the placebo (n = 30, red) and probiotic (n = 30, green) groups, respectively. (D) Score plots from OPLS-DA models at the 60 days follow-up (t60); comparison between 60 days follow-up in the placebo (n = 30, red) and probiotic (n = 30, green) groups, respectively.

The present results showed that plasma metabolomic profiles could distinguish groups and changed by means of the probiotic intervention, since plasma samples at baseline were differentiated from those after probiotic milk consumption. However, although the model possessed a satisfactory fit, the OPLS-DA score plot did not show clear separation because an overfitting of data was observed (Fig. 3B).

Although the validation parameters from OPLS-DA models were slightly higher in probiotic group compared to placebo group, spectra of plasma samples in placebo group (Fig. 3A) also showed a separation trend after sterilized milk consumption. In addition, the absence of samples differentiation at baseline and 60 days post treatments (Fig. 3C and D) points out an effect of the interventions. Since the experiment was designed to detect effects of probiotics in the context of a milk product, and not the effect of the milk itself, we cannot rule out effects from other factors. Therefore, the similar response in both treatment groups ( $R^2Y$  higher than 0.5) suggests a possible response to the delivering vehicle.

The milk was chosen as delivering vehicle in this study, because fermented dairy foods remain at the forefront of probiotic delivery.<sup>34</sup> Pedersen *et al.*<sup>15</sup> also performed a NMR-based metabonomic study to detect metabolomic differences after consumption of a probiotic and a non-probiotic acidified milk. They found metabolic profile changes in plasma of patients with irritable bowel syndrome (IBS) from both probiotic and non-probiotic acidified milk groups; however, similarly to our results, they were not able to detect a greater influence of the probiotics compared to an acidified milk (without probiotic).

It is known that individual milk components contribute to its high biological and nourishing value. For instance, *in vivo* digestion of milk proteins within the GIT can result in the release of peptides with new biological properties. Many of these protein fragments, also known as bioactive peptides, exhibit a wide variety of physiological functions in the human body such as gastrointestinal, cardiovascular, immune, endocrine, and nervous systems.<sup>35-36</sup>

However, although studies have focused on the metabolomic effects of human milk,<sup>37-38</sup> limited information is available with respect to the influence of cow milk metabolites/components on human metabolomics profile.<sup>39</sup>

Conversely, the metabolomic interactions between the human host and probiotics were already evaluated in conditions such as IBS<sup>11,15</sup>, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)<sup>12</sup>, cirrhosis<sup>13</sup>, mastitis<sup>14</sup> and obesity<sup>16</sup>. Since these studies mostly evaluated effects of *Lactobacillus* strains, to the extent of our knowledge, this is the first metabonomic report on the effects of a *Bifidobacterium* species in overweight humans. Additionally, it is noted that our evaluation of only female volunteers, excludes a factor of intrinsic variation among subjects, since significant differences between males and females can be observed in the serum/plasma metabolome.<sup>40,41</sup>

At last, in the second section of results of this study, we intend to use the variable importance in projection (VIP) scores, which indicates the contribution of the individual variable in the definition of the model, for the identification of significant metabolites, ie the responsible metabolites for discrimination between baseline and post-treatment in both probiotic and placebo groups. Since our previous studies with *B. lactis* strain described significant effects in patients with and without MetS,<sup>21-22</sup> we will also investigate if the change in parameters related to obesity, blood lipids, and inflammatory/oxidative stress markers can be associated with metabolic intermediates.

#### **4.4 CONCLUSION**

The separation of the two groups of overweight women with respect to their plasma metabolite profiles after the dietary interventions suggests a general effect of consumption of both probiotic and placebo milks. Therefore, our results indicate that the delivering vehicle has an effect in itself and this means that it is important to consider the mode of delivering of

microorganisms and its impact in the study outcome, when conducting probiotic intervention studies.

In addition, the responsible metabolites for discrimination between baseline and post-treatment in both probiotic and placebo groups will be evaluate and possibly will help us understand how metabolic balances were disturbed by these interventions and/or if there is any correlation with biomarkers of obesity/overweight.

#### 4.5 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the CNPq for the support through the project (142385/2014-0). We also acknowledge the support of Laboratório Multiusuário de Espectroscopia/SPEC-RMN - Universidade Estadual de Londrina and Confepar Agro-industrial Cooperativa Central for donation of skim milk powder.

#### REFERENCES

- 1 M. G. Rooks and W.S. Garrett, Gut microbiota, metabolites and host immunity, *Nat Rev Immunol.*, 2016, **16**, 341–352.
- 2 C. Hill, F. Guarner, G. Reid, G. R. Gibson, D. J. Merenstein, B. Pot, L. Morelli, R. B. Canani, H. J. Flint, S. Salminen, P. C. Calder and M. E. Sanders, Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*, 2014, **11**, 506-514.
- 3 K. R. Pandey, S. R. Naik and B. V. Vakil, Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *J. Food Sci. Technol.*, 2015, **52**, 7577–7587.

- 4 B. Sánchez, S. Delgado, A. Blanco-Míguez, A. Lourenço, M. Gueimonde and A. Margolles, Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease, *Mol Nutr Food Res.*, 2017, **61**, 1600240.
- 5 D. K. Dahiya, Renuka, M. Puniya, U. K. Shandilya, T. Dhewa, N. Kumar, S. Kumar, A. K. Puniya and P. Shukla, Gut microbiota modulation and its relationship with obesity using prebiotic fibers and probiotics: a review, *Front Microbiol.* 2017, **8**, 563.
- 6 H. Chung, J. Sim, T. Min, and H. Choi, Metabolomics and lipidomics approaches in the science of probiotics: a review, *J Med Food*, 2018, **21**, 1086–1095.
- 7 M. Wang, X. Zhang, Y. Wang, Y. Li, Y. Chen, H. Zheng, F. Ma, C. W. Ma, B. Lu, Z. Xie. and Q. Liao, Metabonomic strategy for the detection of metabolic effects of probiotics combined with prebiotic supplementation in weaned rats, *RSC Adv.*, 2018, **8**, 5042.
- 8 R. Vázquez-Fresno, R. Llorach, J. Marinic, S. Tulipani, M. Garcia-Aloy, I. Espinosa-Martos, E. Jiménez, J. M. Rodríguez and C. Andres-Lacueva, Urinary metabolomic fingerprinting after consumption of a probiotic strain in women with mastitis. *Pharmacol. Res.*, 2014, **87**, 160–165.
- 9 H. Zheng, C. C. Yde, T. K. Dalsgaard, K. Arnberg, C. Mølgaard, K. F. Michaelsen, A. Larnkjær and H. C. Bertram, Nuclear magnetic resonance-based metabolomics reveals that dairy protein fractions affect urinary urea excretion differently in overweight adolescents, *Eur Food Res Technol.*, 2015, **240**, 489–497.
- 10 T. W. Fan and A. N. Lane, Applications of NMR spectroscopy to systems biochemistry, *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.*, 2016, **92-93**, 18-53.
- 11 Y. S. Hong, K. S. Hong and M. H. Park, Metabonomic understanding of probiotic effects in humans with irritable bowel syndrome, *J. Clin Gastroenterol.*, 2011, **45**, 415-425.

- 12 A. Miccheli, G. Capuani, F. Marini, A. Tomassini, G. Praticò, S. Ceccarelli, D. Gnani, G. Baviera, A. Alisi, L. Putignani and V. Nobili, Urinary <sup>1</sup>H-NMR-based metabolic profiling of children with NAFLD undergoing VSL#3 treatment, *Int J. Obes.*, 2015, **39**, 1118–1125.
- 13 J. S. Bajaj, D. M. Heuman, P. B. Hylemon, A. J. Sanyal, P. Puri, R. K. Sterling, V. Luketic, R. T. Stravitz, M. S. Siddiqui, M. Fuchs, L. R. Thacker, J. B. Wade, K. Daita, S. Sistrun, M. B. White, N. A. Noble, C. Thorpe, G. Kakiyama, W. M. Pandak, M. Sikaroodi and P. M. Gillevet, Randomised clinical trial: *Lactobacillus* GG modulates gut microbiome, metabolome and endotoxemia in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther.*, 2014, **39**, 1113–1125.
- 14 R. Vázquez-Fresno, R. Llorach, J. Marinic, S. Tulipani, M. Garcia-Aloy, I. Espinosa-Martos, E. Jiménez, J. M. Rodríguez and C. Andres-Lacueva, Urinary metabolomic fingerprinting after consumption of a probiotic strain in women with mastitis. *Pharmacol Res.*, 2014, **87**, 160–165.
- 15 S. M. Pedersen, C. Nebel, N. C. Nielsen, H. J. Andersen, J. Olsson, M. Simrén, L. Öhman, U. Svensson, H. C. Bertram and A. Malmendal, A GC–MS-based metabonomic investigation of blood serum from irritable bowel syndrome patients undergoing intervention with acidified milk products, *Eur Food Res Technol.*, 2011, **233**, 1013–1021.
- 16 M. Kim, M. Kim, M. Kang, H. J. Yoo, M. S. Kim, Y. Ahn, J. Sim, S. H. Jee and J. H. Lee, Effects of weight loss using supplementation with *Lactobacillus* strains on body fat and medium-chain acylcarnitines in overweight individuals, *Food Funct.*, 2017, **8**, 250–261.
- 17 P. K. Gopal, J. Prasad, J. Smart and H. S. Gill, *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol*, 2001, **67**, 207–216.

- 18 M. Ahmed, J. Prasad, H. Gill, L. Stevenson and P. Gopal, Impact of consumption of different levels of *Bifidobacterium lactis* HN019 on the intestinal microflora of elderly human subjects, *J Nutr Health Aging*, 2007, **11**, 26-31.
- 19 P. A. Waller, P. K. Gopal, G. J. Leyer, A. C. Ouwehand, C. Reifer, .M. E. Stewart and L. E. Miller, Dose-response effect of *Bifidobacterium lactis* HN019 on whole gut transit time and functional gastrointestinal symptoms in adults, *Scand. J. Gastroenterol.*, 2011, **49**, 1057-1064.
- 20 L. E Miller, L. Lehtoranta and M. J. Lehtinen, The effect of *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* HN019 on cellular immune function in healthy elderly subjects: Systematic review and meta-analysis, *Nutrients*, 2017, **9**, E191.
- 21 L. J. Bernini, A. N. Simão, D. F. Alfieri, M. A. Lozovoy, N. L. Mari, C. B. de Souza, I. Dichi and G. N. Costa, Beneficial effects of *Bifidobacterium lactis* on lipid profile and cytokines in patients with metabolic syndrome: A randomized trial, *Nutrition*, 2016, **32**, 716-719.
- 22 L. J. Bernini, A. N. C. Simão, C. H. B. de Souza, D. F. Alfieri, L. G. Segura, G. N. Costa and I. Dichi, Effect of *Bifidobacterium lactis* HN019 on inflammatory markers and oxidative stress in subjects with and without the metabolic syndrome, *Br. J. Nutr.*, 2018, **120**, 645-652.
- 23 S. V. Castele, T. Vanheuverzwijn, T. Ruysen, P. Van Assche, J. Swings and G. Huys, Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. *Int Dairy J.*, 2006, **16**, 1470–1476.
- 24 World Health Organization (WHO). WHO Obesity and overweigh Fact sheet N°. 311, 2018.

- 25 O. Beckonert, H. C. Keun, T. M. Ebbels, J. Bundy, E. Holmes, J. C. Lindon and J. K. Nicholson, Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts, *Nat Protoc.*, 2007, **2**, 2692-2703.
- 26 J. Chong, O. Soufan, C. Li, I. Caraus, S. Li, G. Bourque, D. S. Wishart and J. Xia, MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis, *Nucleic Acids Res.*, 2018, **46**, W486–W494.
- 27 A. Jain, D. Kumar, A. Guleria, D. P. Misra, A. Zanwar, S. Chaurasia, S. Kumar, U. Kumar, S. K. Mishra, R. Goel, D. Danda and R. Misra, NMR-Based serum metabolomics of patients with takayasu arteritis: relationship with disease activity, *J. Proteome Res.*, 2018, **17**, 3317-3324.
- 28 X. Shi, C. Xiao, Y. Wang and H. Tang, Gallic acid intake induces alterations to systems metabolism in rats, *J. Proteome Res.*, 2013, **12**, 991–1006.
- 29 J. Xia and D. S. Wishart, Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst, *Nat. Protoc.*, 2011, **6**, 743- 760.
- 30 J. Trygg, E. Holmes and T. Lundstedt, Chemometrics in metabonomics, *J. Proteome Res.*, 2007, **6**, 469–479.
- 31 B. Worley and R. Powers, Multivariate Analysis in Metabolomics, *Curr. Metabolomics*, 2012, **1**, 92–107.
- 32 P. G. Takis, M. Oraiopoulou, C. Konidaris and A. N. Troganis, <sup>1</sup>H-NMR based metabolomics study for the detection of the human urine metabolic profile effects of *Origanum dictamnus* tea ingestion, *Food Funct.*, 2016, **7**, 4104.
- 33 J. Li, B. Liu, M. Cai, X. Lin and S. Lou, Glucose metabolic alterations in hippocampus of diabetes mellitus rats and the regulation of aerobic exercise. *Behav Brain Res.*, 2017, S0166-4328(17)31309-8.

- 34 C. S. Ranadheera, J. K. Vidanarachchi, R. S. Rocha, A. G. Cruz and S. Ajlouni. Probiotic Delivery through Fermentation: Dairy vs. Non-Dairy Beverages. *Fermentation*, 2017, **3**, 67.
- 35 V. Raikos and T. Dassios, Health-promoting properties of bioactive peptides derived from milk proteins in infant food: a review, *Dairy Sci Technol.*, 2014, **94**, 91-101.
- 36 R. Nagpal, P. Behare, R. Rana, A. Kumar, M. Kumar, S. Arora, F. Morotta, S. Jain and H. Yadav, Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update, *Food Funct.*, 2011, **2**, 18-27.
- 37 C. Gómez-Gallego, J. M. Morales, D. Monleón, E. du Toit, H. Kumar, K. M. Linderborg, Y. Zhang, B. Yang, E. Isolauri, S. Salminen and Maria Carmen Collado, Human breast milk NMR metabolomic profile across specific geographical locations and its association with the milk microbiota, *Nutrients*, 2018, **10**, E1355.
- 38 F. C. Marincola, A. Noto, P. Caboni, A. Reali, L. Barberini, M. Lussu, F. Murgia, M. Santoru, L. Atzori and V. Fanos, A metabolomic study of preterm human and formula milk by high resolution NMR and GC/MS analysis: preliminary results, *J. Matern Fetal Neonatal Med.*, 2012, **25**, 62-67.
- 39 H. C. Bertram, C. Hoppe, B. O. Petersen, J. Ø. Duus, C. Mølgaard and K. F. Michaelsen, An NMR-based metabonomic investigation on effects of milk and meat protein diets given to 8-year-old boys, *Br J Nutr.*, 2007, **97**, 758-763.
- 40 J. Krumsiek, K. Mittelstrass, K. T. Do, F. Stückler, J. Ried, J. Adamski, A. Peters, T. Illig, F. Kronenberg, N. Friedrich, M. Nauck, M. Pietzner, D. Mook-Kanamori, K. Suhre, C. Gieger, H. Grallert, F. J. Theis and G. Kastenmüller. Gender-specific pathway differences in the human serum metabolome, *Metabolomics*, 2015, **11**, 1815-1833.
- 41 C. M. Slupsky, K. N. Rankin, J. Wagner, H. Fu, D. Chang, A. M. Weljie, E. J. Saude, B. Lix, D. J. Adamko, S. Shah, R. Greiner, B. D. Sykes and T. J. Marrie, Investigations of the effects of gender, diurnal variation, and age in human urinary metabolomic profiles, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 6995-7004.

## CONCLUSÃO GERAL

Neste estudo, a formulação de um leite probiótico contendo *Bifidobacterium lactis* HN019 e introdução deste produto na dieta de um grupo de mulheres com sobrepeso, possibilitou a avaliação do potencial fermentador desse microrganismo e seu efeito sobre a assinatura digital metabólica da população em estudo, além da investigação do impacto *in vitro* da linhagem isolada sobre a microbiota fecal humana.

Pela primeira vez, ácido acético e láctico foram quantificados, via RMN de  $^1\text{H}$ , como metabólitos produzidos pela linhagem HN019 durante a fermentação em leite. A linhagem demonstrou uma maior produção de acetato em comparação a outras linhagens de bifidobactérias; no entanto, a proporção molar de 3:2 de acetato/lactato, após 12 horas de fermentação, coincidiu com o rendimento teórico descrito na literatura para o metabolismo do gênero *Bifidobacterium*. Na avaliação sensorial o leite probiótico fermentado por oito horas apresentou melhor aceitabilidade, uma vez que a fermentação longa, por 72 horas, culminou em um produto com os “defeitos” típicos do metabolismo de bifidobactérias, tais como alta acidez e sabor avinagrado. Nesse sentido, este estudo permitiu uma melhor compreensão das variações de sabor no leite fermentado, uma vez que a produção de ácido acético e láctico podem determinar a aceitação do produto final.

A fermentação *in vitro* das linhagens HN019 e *B. lactis* Bb12 não ocasionou uma mudança significativa nos principais grupos microbianos da microbiota fecal humana ou na produção de ácidos graxos de cadeia curta. No entanto, quando associadas a fruto-oligossacarídeo, os simbióticos resultantes provocaram modulações benéficas na microbiota (aumento de bifidobactérias e produção de acetato e butirato), em virtude da adição do componente prebiótico.

Na investigação metabólica *in vivo* a análise multivariada dos dados demonstrou, por meio da diferenciação das amostras entre a linha de base e o pós-consumo, o efeito do leite fermentado contendo a linhagem HN019 na assinatura digital metabólica do plasma de mulheres com sobrepeso. Todavia, um impacto similar foi observado após o consumo do leite esterilizado (placebo), o que sugere um efeito do veículo do probiótico na modulação metabólica observada.

Dessa forma, a construção de modelos metabonômicos baseados na RMN de  $^1\text{H}$  possibilitou a identificação dos efeitos globais do consumo de um produto lácteo em mulheres com sobrepeso. Além disso, embora outras técnicas analíticas para quantificação de ácidos já tenham sido consolidadas, o presente estudo demonstrou que a RMN de  $^1\text{H}$  quantitativa

apresentou resultados robustos na quantificação de ácidos láctico e acético e lactose em leite, demonstrando a relevância dessa técnica tanto no estudo de metabólitos na matriz alimentícia quanto no efeito de alimentos em biofluidos humanos.

Até o momento, os nossos dados sugerem que intervenções clínicas com o uso de um leite fermentado contendo a linhagem HN019 podem alterar o metabolismo humano de acordo com a modulação metabólica por probióticos. Nesse sentido, visto que o desafio atual está em identificar bactérias benéficas que ajudem no controle do sobrepeso e de desordens metabólicas relacionadas, novos estudos são necessários com o intuito de elucidar os mecanismos pelos quais a ingestão de leite esterilizado e/ou a linhagem HN019 podem modular de maneira positiva o metabolismo de indivíduos com sobrepeso.

## **ANEXOS**

## ANEXO I ARTIGO

International Food Research Journal 26(2): xx - xx (April 2019)

Journal homepage: <http://www.ifrj.upm.edu.my>



### *Bifidobacterium lactis* HN019: survival, acid production and impact on sensory acceptance of fermented milk

<sup>1</sup>Henrique-Bana, F. C., <sup>2</sup>Macedo Jr, F., <sup>3</sup>Oliveira, L. G. S., <sup>1</sup>Takihara, A. M.,  
<sup>1</sup>Miglioranza, L. H. S., <sup>1</sup>Spinosa, W. A. and <sup>3</sup>Costa, G. N.

<sup>1</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 86057-970, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 86057-970, Brazil

<sup>3</sup>Mestrado Acadêmico em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Universidade Norte do Paraná, Londrina, PR, 86041-100, Brazil

#### Article history

Received: 26 May 2016

Received in revised form:

18 October 2018

Accepted: 14 December 2018

#### Keywords

Probiotics

Organic acids

Quantitative <sup>1</sup>H NMR

spectroscopy

Fermented dairy products

#### Abstract

*Bifidobacterium lactis* HN019 was monitored for its viability and acid production during milk fermentation and cold storage. Milk was fermented for 72 h at 37°C, and the shelf life of the resulting probiotic milk was evaluated at 4°C for 30 d. Additionally, lactic and acetic acids and lactose contents during the fermentation were measured by *in situ* quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (isq <sup>1</sup>H NMR), and the sensorial acceptance of the fermented milk was evaluated by 80 panellists. The pH of the milk fermented by *B. lactis* HN019 reduced from 6.36 to 3.97 after 72 h incubation. The viability of the evaluated strain was maintained above 9.21 up to a decrease to 8.85 log CFU/mL after 48 h fermentation. With respect to metabolism, isq <sup>1</sup>H NMR revealed that the acetic and lactic acid contents increased from 0.47 ± 0.06 g/L to 16.36 ± 1.86 g/L and 2.59 ± 0.10 g/L to 9.40 ± 0.18 g/L, respectively, indicating high production of acetic acid by HN019 during the 72 h fermentation. On the other hand, lactose content decreased throughout the fermentation period. In fact, strain HN019 showed a high content of acetate throughout fermentation; however, exhibited the stability required in fermented milks with high viable cell counts and low activity of post-acidification during the shelf life. In sensory evaluation, the panellists preferred the probiotic milk fermented for 8 h because after 72 h the acetic flavour was already perceptible.

© All Rights Reserved

#### Introduction

Fermented milks containing probiotics have been extensively explored. Of these dairy products, products obtained using Bifido strains are an important category worldwide. In fact, *Bifidobacterium* is one of the most important groups of probiotic cultures used in fermented milk production owing to their well-documented health-promoting properties in human host (Urita *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2016). However, the production of fermented milk using bifidobacteria is a great challenge in the dairy industry because milk is not a suitable matrix for the growth of this genus as they lack essential proteolytic activity (Prasanna *et al.*, 2014). Thus, a longer fermentation time is required thereby resulting in some defects, such as sandy or slimy texture, yeasty or vinegary taste, or

insufficient aroma (Sreeja and Prajapati, 2015).

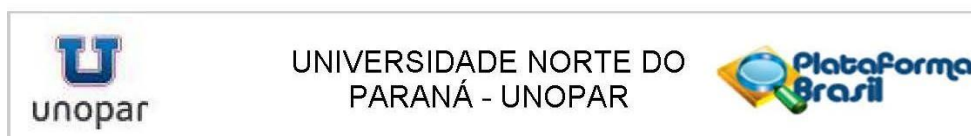
*Bifidobacterium* is not included in the traditional lactic acid bacteria (LAB) group due to its genetic and physiological unrelatedness. However, for practical and traditional reasons, it is considered as belonging to the LAB order (Russel *et al.*, 2011). Moreover, bifidobacteria differ from other colonic genera with respect to the mechanism employed to ferment carbohydrates (Mayo *et al.*, 2010). Bifidobacteria metabolise hexoses using the “bifidus pathway”, whose key enzyme is fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK), which leads to a theoretical molar ratio of acetate to lactate of 3:2 (Scardovi *et al.*, 1971). Furthermore, it has been suggested that the proportion of the final fermentation products varies considerably from one strain to another, and is dependent on the carbon source used and the growth phase (Oliveira *et al.*, 2009).

\*Corresponding author.

Email: [fwrcbenrique@gmail.com](mailto:fwrcbenrique@gmail.com)

## ANEXO II

PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA  
 REALIZAÇÃO DO ENSAIO *IN VIVO* (CAPÍTULO 4) E ANÁLISE SENSORIAL DO  
 LEITE DESENVOLVIDO NO ESTUDO (CAPÍTULO 2).



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** EFEITOS METABÓLICOS DE *Bifidobacterium lactis* HN019 EM INDIVÍDUOS COM SOBREPESO

**Pesquisador:** Giselle Aparecida Nobre Costa

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 67602217.1.0000.0108

**Instituição Proponente:** Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio  
 Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.183.534

**Apresentação do Projeto:**

A literatura científica relata muitos estudos tratando do benefício de microrganismos probióticos sobre os organismos humano e animal. Dentre os vários efeitos atribuídos aos probióticos, a capacidade de prevenir e/ou tratar algumas disbioses têm sido relacionados à capacidade destes em modular a microbiota intestinal e/ou a fisiologia do hospedeiro em razão da alteração de metabólitos chave, ditos marcadores bioquímicos. Nestes estudos, a associação dos efeitos positivos à saúde são cada vez mais atrelados à linhagens específicas. Deste modo, este projeto tem como objetivo avaliar os efeitos do probiótico *Bifidobacterium lactis* HN019 em 80 voluntários adultos portadores de sobrepeso. O ensaio clínico foi delineado como duplo cego randomizado, no qual 40 indivíduos serão alocados no grupo tratado e 40 no grupo placebo. O grupo tratado receberá diariamente um leite probiótico contendo *B. lactis* HN019 durante 60 dias, enquanto que o grupo placebo receberá um leite esterilizado durante igual período. Serão coletadas amostras sanguíneas e fecais no tempo zero e aos sessenta dias de tratamento. Os efeitos do probiótico serão avaliados através do perfil lipídico e glicêmico por dosagem de colesterol total e frações, triacilglicerídeos -glutamyltransferase, alanino aminotransferase, aspartato aminotransferase, glicose e insulina, ferritina e hemoglobina. Os efeitos no sistema imunomodulador, será avaliado por dosagem das citocinas IL-1, IL-6, interferon (IFN-) e fator de necrose tumoral (TNF-alfa). O

**Endereço:** Rua Marselha, 591

**Bairro:** Jardim Piza

**CEP:** 86.041-140

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-9849

**E-mail:** cep@unopar.br



UNIVERSIDADE NORTE DO  
PARANÁ - UNOPAR



Continuação do Parecer: 2.183.534

pró - hormônio Glucagon Like peptídeo-1, o peptídeo YY também serão avaliados. Já o perfil de metabólitos será avaliado por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN H1) nos mesmos períodos propostos. Os dados obtidos serão avaliados utilizando o teste Wilcoxon para verificar mudanças na linha de base (mudanças intra-grupos) e o teste de Dunn (post-hoc) para observar as diferenças entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

#### **Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:** Avaliar os efeitos da ingestão de um leite probiótico contendo Bifidobacterium lactis HN019 durante um período de 60 dias, sobre o metabolismo lipídico, glicídico, sistema imunomodulador, bem como avaliar o perfil metabólico de um grupo de adultos com sobrepeso. **Objetivo Secundário:** Investigar a capacidade da linhagem B. lactis HN019 em melhorar o perfil lipídico e glicêmico além do sistema imunomodulador de humanos; Analisar os principais metabólitos no plasma sanguíneo e/ou amostras fecais dos voluntários que ingeriram o leite probiótico e leite esterilizado por meio da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear; Avaliar as alterações metabólicas associando-as quando pertinente, aos efeitos benéficos do probiótico B. lactis HN019.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Os voluntários, participantes da pesquisa poderão apresentar alergia às proteínas do leite, intolerância à lactose, e por consequência, apresentarem: erupções de pele, flatulência, cólica, diarreia e/ou enjoo. Os voluntários serão instruídos a contactar a equipe de pesquisadores à qualquer momento, caso apresente quaisquer dos sintomas previstos e lhe será recomendado a suspensão da ingestão do leite probiótico ou

leite esterilizado, bem como observação do seu quadro clínico. Os sintomas descritos costumam cessar com a interrupção do consumo do produto. No entanto, caso estes persistam, o voluntário será instruído a procurar atendimento médico a fim de investigar a causa dos sintomas apresentados. **Benefícios:** O desenvolvimento deste projeto poderá contribuir para continuidade do estudo de verificação dos efeitos clínicos de Bifidobacterium lactis HN019 na população alvo, uma vez que um estudo anterior deste mesmo grupo de pesquisas observou efeitos positivos em indivíduos obesos portadores de síndrome metabólica. Espera-se que o produto probiótico ingerido altere o perfil lipídico/glicídico bem como de alguns metabólitos do sistema imunomodulador dos participantes, estas alterações podem ocasionar efeitos benéficos à sua

**Endereço:** Rua Marselha, 591

**Bairro:** Jardim Piza

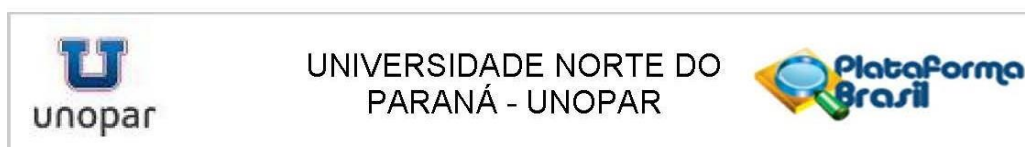
**CEP:** 86.041-140

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-9849

**E-mail:** cep@unopar.br



Continuação do Parecer: 2.183.534

saúde. Além disso, pode contribuir com o desenvolvimento de um produto probiótico voltado ao público que tenha restrição ao consumo de açúcares convencionais. Adicionalmente, o projeto envolve discentes de programas de mestrado e doutorado contribuindo assim para a formação de recursos humanos qualificados.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Sem comentários ou considerações.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os documentos de apresentação obrigatória "Folha de rosto", "Cronograma", "Autorização da Autarquia Municipal de Apucarana", Informações Básicas do Projeto" e TCLEs foram postados e atendem às exigências da resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Todas as recomendações de pareceres anteriores foram atendidas pela pesquisadora.

**Recomendações:**

Sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O projeto atende à Resolução CNS nº 466/12 e/ou 510/2016 do Conselho Nacional de Saúde. Deverão ser apresentados relatórios parciais e/ou final a cada 12 meses a partir da data de aprovação do projeto. Caso os relatórios não sejam apresentados, o CEP poderá suspender temporariamente novas análises de outros projetos de pesquisa do mesmo pesquisador. Qualquer alteração deve ser informada ao CEP como EMENDA ao projeto.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_776411.pdf	10/07/2017 14:25:08		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoEfeitoHN019CEPE.pdf	10/07/2017 12:16:55	Giselle Aparecida Nobre Costa	Aceito
Outros	TECLEProjetoHN019Sensorial.pdf	10/07/2017 12:15:33	Giselle Aparecida Nobre Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TECLEProjetoHN019invivo.pdf	10/07/2017 12:14:42	Giselle Aparecida Nobre Costa	Aceito

**Endereço:** Rua Marselha, 591  
**Bairro:** Jardim Piza **CEP:** 86.041-140  
**UF:** PR **Município:** LONDRINA  
**Telefone:** (43)3371-9849 **E-mail:** cep@unopar.br



UNIVERSIDADE NORTE DO  
PARANÁ - UNOPAR



Continuação do Parecer: 2.183.534

Justificativa de Ausência	TECLEProjetoHN019invivo.pdf	10/07/2017 12:14:42	Giselle Aparecida Nobre Costa	Aceito
Outros	AutorizSecSaude.pdf	02/06/2017 11:39:10	Giselle Aparecida Nobre Costa	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	24/04/2017 15:52:43	Giselle Aparecida Nobre Costa	Aceito
Outros	PrestServicosCETEL.pdf	02/04/2017 00:53:49	Giselle Aparecida Nobre Costa	Aceito
Outros	FichaAnaliseSensorial.pdf	02/04/2017 00:50:15	Giselle Aparecida Nobre Costa	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

LONDRINA, 25 de Julho de 2017

---

Assinado por:  
**Audrey de Souza Marquez**  
(Coordenador)

**Endereço:** Rua Marselha, 591

**Bairro:** Jardim Piza

**CEP:** 86.041-140

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-9849

**E-mail:** cep@unopar.br